



Departamento de Biología Molecular

PrimPol, una nueva primasa/polimerasa en células humanas

Sara I. García Gómez

Madrid, 2013

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

PrimPol, una nueva primasa/polimerasa en células humanas

**Memoria presentada por Sara I. García Gómez, Licenciada en Biología, para
optar al Grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de
Madrid.**

Prof. Luis Blanco Dávila, Director de Tesis.

Dra. María Isabel Martínez Jiménez, Directora de Tesis.

Madrid

**El trabajo recogido en esta memoria ha sido llevado a cabo en el
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC/UAM),
bajo la dirección del Prof. Luis Blanco Dávila
y la co-dirección de la Dra. María Isabel Martínez Jiménez.**

ÍNDICE

RESUMEN	7
SUMMARY	11
INTRODUCCIÓN	15
1 Replicación del DNA.....	17
2 Primasas	18
2.1 Mecanismo de síntesis del iniciador	19
2.2 Clasificación.....	20
2.2.1 Primasas procarióticas	20
2.2.2 Primasas arqueo-eucarióticas	22
3 DNA polimerasas.....	24
3.1 Estructura y mecanismo común para las DNA polimerasas.....	25
4 Papel de las DNA polimerasas eucariotas en mecanismos de mantenimiento del genoma.....	26
4.1 Replicación del genoma nuclear.....	27
4.2 Replicación y mantenimiento del genoma mitocondrial.....	27
4.3 Reparación	28
4.3.1 Reparación por escisión de nucleótido (NER).....	29
4.3.2 Reparación por escisión de base (BER)	29
4.3.3 Reparación de uniones intra- o intercatenarias del DNA.....	30
4.3.4 Reparación de roturas de doble cadena.....	30
4.3.5 Reparación de apareamientos erróneos	32
4.4 Replicación del DNA dañado	32
4.5 Desarrollo del sistema inmune	33
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1 Materiales	41
1.1 Reactivos	41
1.2 Enzimas	41
1.3 Nucleótidos	41
1.4 DNA y RNA oligonucleótidos	41
2 Métodos.....	41
2.1 Clonaje y mutagénesis dirigida.....	41
2.1.1 Clonaje del cDNA de la proteína codificada por el gen CCDC111 humano (hPrimPol)	42
2.1.2 Diseño y construcción de las proteínas con mutaciones puntuales	42
2.1.3 Diseño y construcción de la proteína mutada de deleción PrimPol Δ Zn	42
2.2 Expresión y purificación de la proteína PrimPol y todas sus variantes	42
2.3 Sedimentación en gradientes de glicerol.....	43
2.4 Ensayos de la actividad primasa	43

2.4.1 Ensayo de la actividad primasa sobre el sustrato M13cs.....	43
2.4.2 Ensayo de la actividad primasa sobre DNA lineal	43
2.5 Medida de la actividad ATPasa	43
2.6 Marcaje radiactivo de DNA e hibridación para la obtención de estructuras del tipo molde/iniciador	44
2.7 Ensayos polimerasa.....	44
2.7.1 Polimerización a través de bases modificadas	44
2.7.2 Polimerización a través de sitios abásicos	45
2.7.3 Polimerización a través de un dímero de timinas	45
2.8 Ensayo de unión a DNA.....	45
2.9 Ensayo de actividad deoxirribosafosfato liasa (dRP-liasa)	45
2.10 Producción de anticuerpos contra hPrimPol	46
2.11 Inmunodetección de proteínas en membrana (Western blot)	46
RESULTADOS	51
1 Una nueva primasa de la superfamilia AEP en eucariotas.....	53
1.1 Identificación del gen humano CCDC111 como una Primasa Arqueo-Eucariota.....	55
1.2 Conservación evolutiva.....	57
1.3 Clonaje, sobre-expresión y purificación de la proteína humana ccdc111	57
2 Actividad primasa de la ccdc111 humana	59
2.1 Detección temprana de la actividad primasa de ccdc111 en el extracto celular obtenido tras su sobreproducción en <i>E. coli</i>	61
2.2 Ccdc111 tiene actividad primasa intrínseca	61
2.2.1 Uso de metales durante la reacción de primado por ccdc111	62
2.3 Mecanismos de acción de ccdc111 durante la iniciación	63
2.3.1 Uso de secuencias de orígenes de replicación de HSV1	64
2.3.2 Actividad primasa dependiente de molde (mapeo del sitio64 de iniciación en oligos que contienen el origen de replicación de HSV1)	64
2.3.3 Estudio de la formación del dinucleótido (especificidad de los sitios 5' y 3')	66
2.3.4 La síntesis del dinucleótido es el paso limitante.....	70
2.3.5 Uso de análogos de nucleótidos en el extremo 5' del iniciador	70
2.3.6 Uso de metales durante la síntesis del iniciador	71
2.4 Especificidad de secuencia para la iniciación.....	72
2.4.1 Dinucleótidos formados preferentemente por ccdc111	72
2.4.2 Mutaciones sobre una secuencia de reconocimiento válida.....	73
2.4.3 Actividad primasa sobre oligos de secuencia heterogénea.....	77
2.5 La actividad primasa de ccdc111 requiere reconocer el molde como cadena sencilla de DNA	78
3 Actividad polimerasa de la PrimPol humana	81
3.1 PrimPol tiene actividad DNA polimerasa intrínseca.....	84
3.2 PrimPol sintetiza DNA de forma distributiva	85

3.3 Fidelidad de síntesis	85
3.4.1 Uso de metales durante la polimerización.....	87
3.4 PrimPol carece de actividad correctora de errores y extiende difícilmente extremos desapareados	87
3.5 Análisis de la afinidad de PrimPol por dNTPs	88
3.6 Discriminación del 3'OH del nucleótido	89
3.7 Actividad de desplazamiento de cadena	90
3.8 PrimPol tiene actividad DNA y RNA polimerasa intrínseca	91
3.9 Actividad retrotranscriptasa de PrimPol.....	92
3.10 Actividad sobre sustratos de reparación.....	92
3.10.1 PrimPol carece de actividad dRP-liasa	93
4 Estudio del centro activo de PrimPol.....	95
4.1 Predicción de residuos implicados en la catálisis	97
4.2 Demostración de la importancia funcional de los residuos identificados.....	99
4.2.1 Motivo A, Asp ¹¹⁴ y Glu ¹¹⁶	99
4.2.2 Motivo C, Asp ²⁸⁰	101
4.2.3 Motivo B, His ¹⁶⁹	102
5 Implicación de PrimPol en tolerancia a lesiones en el DNA.....	105
5.1 Tolerancia a daño oxidativo	107
5.1.1 Síntesis a través de 8oxoG en el molde	107
5.1.2 Síntesis usando 8oxo-dGTP y 8oxo-GTP como sustrato	109
5.1.3 8oxoGTP en primasa.....	110
5.2 Síntesis a través de moldes con sitios abásicos	112
5.2.1 Actividad primasa sobre sitios abásicos.....	116
5.3 Síntesis a través de dímeros de timinas.....	116
5.3.1 Dímero de timinas y actividad primasa.....	119
5.4 Síntesis a través de 5-fluorouacilo (5FU).....	120
5.5 Síntesis a través de O ⁶ -metilguanina.....	121
5.6 Síntesis a través de modificaciones de la citosina	123
5.7 Requerimiento de manganeso para la translesión	124
6 Función del dominio de unión a zinc de PrimPol.....	127
6.1 PrimPol posee un posible dominio de unión a zinc	129
6.1.1 Mutagénesis dirigida del dominio dedo de zinc.....	131
6.2 Implicación del dedo de zinc en la actividad primasa de PrimPol	131
6.3 Implicación del dedo de zinc en la actividad polimerasa de PrimPol.....	136
6.3.1 Análisis de la afinidad de PrimPolΔZn por dNTPs	138
6.3.2 PrimPolΔZn en síntesis translesión	139
6.4 Modelo mecanístico de función del dominio dedo de zinc en PrimPol.....	142
7 Contexto celular de PrimPol.....	145
7.1 Localización subcelular de PrimPol humana	147
7.2 Función de PrimPol en el compartimento mitocondrial.....	148

7.2.1 Posible primasa en mitocondria responsable de la iniciación en el OriL del mtDNA.....	148
7.2.2 Síntesis a través de lesiones: Poly vs PrimPol.....	150
7.2.3 Pol y utiliza eficientemente los iniciadores de RNA/DNA sintetizados por PrimPol.....	153
7.2.4 Predicción de secuencia de localización mitocondrial en PrimPol	155
7.3 Inhibidores específicos de PrimPol.....	156
7.3.1 Ara-citidina-5'-trifosfato (AraCTP).....	157
7.3.2 3'-Desoxi-adenosina-5'-trifosfato (3'dATP).....	158
7.3.3 2-Fluoro-ara-adenosina-5'-trifosfato (fludarabina).....	159
7.3.4 2-amino-4-octadecene-1,3-diol (esfingosina)	160
7.3.5 Afidicolina	161
7.3.6 Rifampicina.....	162
DISCUSIÓN.....	165
1 PrimPol, una nueva primasa y polimerasa en células eucarióticas.....	167
1.1 PrimPol es una DNA primasa	167
1.2 PrimPol es una polimerasa muy versátil.....	169
2 Una nueva alternativa para la tolerancia al daño durante la replicación	170
2.1 PrimPol está especializada en polimerizar a través de lesiones	170
2.2 Implicación de PrimPol en la replicación del genoma mitocondrial	173
2.3 Implicación de PrimPol en la replicación del genoma nuclear	175
3 El dominio dedo de zinc de PrimPol, consideraciones estructura-función	176
3.1 El dominio dedo de zinc de PrimPol es esencial en el re-aranque de la horquilla de replicación del DNA nuclear	177
4 Expresión de PrimPol y su posible interés como diana antitumoral	179
CONCLUSIONES.....	181
BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXO	203

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se presenta la purificación y caracterización enzimática de una nueva primasa humana de la superfamilia AEP (primasas arqueas eucariotas). Ccdc111 había sido identificada como un miembro potencial de la superfamilia AEP mediante comparaciones de secuencia de aminoácidos. El gen CCDC111 humano fue subclonado, y la proteína ccdc111 fue sobre-expresada de forma heteróloga en *Escherichia coli*. Ccdc111 fue estabilizada por adición de una cola de histidinas en su extremo amino, lo que posteriormente ayudó a su purificación mediante columnas de afinidad. Se pudo obtener una fracción pura y en concentración suficiente para realizar un detallado análisis enzimático.

En este trabajo se demuestra que, en efecto, ccdc111 posee actividad RNA primasa por ser capaz de utilizar ribonucleótidos para la síntesis de iniciadores (como las primasa convencionales), pero también que es capaz de hacerlo a partir de deoxirribonucleótidos, por lo que posee actividad DNA primasa. El estudio en detalle de su actividad primasa ha revelado que ccdc111 tiene la misma afinidad por los NTPs que por los dNTPs como sustratos del sitio 5' o sitio de iniciación. Sin embargo, presenta una preferencia 100 veces mayor por utilizar dNTPs para el sitio 3' o sitio de elongación. Con respecto a la distinción de determinadas secuencias como señal de reconocimiento y comienzo de la síntesis de iniciadores, ccdc111 reconoce un trímero formado por: una Guanina en primera posición, como nucleótido críptico (que es reconocido pero no copiado); una Pirimidina en segunda posición, de modo que empieza la síntesis usando una purina (fisiológicamente más abundantes) y un tercer nucleótido sobre el que no se ha detectado especial predilección.

Ccdc111 fue capaz de elongar un iniciador pre-existente, demostrando que posee, además, actividad DNA y RNA polimerasa. Debido a la dualidad de ccdc111 como primasa y polimerasa, se modificó su nomenclatura (aprobada por el comité HUGO), llamándose ahora PrimPol. Se identificaron los residuos responsables de la catálisis en el centro activo de PrimPol, tanto de su actividad primasa como de su actividad polimerasa. PrimPol es una DNA polimerasa distributiva, que inserta dNTPs siguiendo el dictado de una cadena molde con unos niveles moderados de fidelidad, a pesar de carecer de actividad correctora de errores. Además, PrimPol polimeriza eficientemente a través de lesiones en el DNA como el 8oxoG, los sitios abásicos, o los dímeros de timinas (del tipo CPD), entre otros daños en el DNA. Estos resultados apoyan la función de PrimPol en tolerancia al daño durante la replicación de DNA.

PrimPol posee un dominio dedo de zinc en su extremo C-terminal, que es esencial para la actividad primasa. Sin embargo, el dedo de zinc resulta ser no solo prescindible para su actividad polimerasa, sino que su eliminación incrementa la eficiencia de polimerización, disminuyendo la K_M por los dNTPs.

Estudios de localización subcelular revelaron que PrimPol se encuentra tanto en el núcleo como en la mitocondria. PrimPol podría estar ejerciendo una función auxiliar durante la replicación del DNA nuclear llevada a cabo por Pol ϵ y Pol δ , y del DNA mitocondrial por Pol γ . PrimPol asistiría a las DNA polimerasas replicativas de ambos compartimentos celulares, que se hubieran detenido frente a una lesión en el DNA molde, actuando como DNA polimerasa de translesión o sintetizando nuevos iniciadores cerca de la lesión, permitiendo así la progresión de la horquilla de replicación.

SUMMARY

This Doctoral Thesis reports the purification and biochemical characterization of a novel human primase belonging to the AEP (Archeo Eukaryotic Primases) superfamily. Ccdc111 had been identified as a putative AEP new member by amino acid sequence comparisons. The human gen CCDC111 was cloned, and ccdc111 was overexpressed in *Escherichia coli*. Ccdc111 was stabilized by adding a histidine tag at its N-terminus, that also facilitated purification through affinity columns. Both the purity achieved and the high yield obtained, allowed a detailed enzymatic analysis of ccdc111

This work shows that, in fact, ccdc111 has RNA primase activity, as it is able to use ribonucleotides to make primers (as conventional primases do), but strikingly, it can initiate synthesis from deoxynucleotides, thus being also a DNA primase. The detailed study of its primase activity demonstrated that ccdc111 has the same affinity for NTPs than for dNTPs as substrates for the 5' site (initiation site); however, ccdc111 displays a 100 higher preference for dNTPs at the 3' site (elongation site). Among the specific template sequences preferred to initiate primer synthesis, ccdc111 recognizes a trinucleotide consisting in: a guanine at the first position, as a cryptic nucleotide (that is recognized but not copied); a pyrimidine at the second position, dictating the start with a purine nucleotide (physiologically more abundant); and any of the four dNTPs at the third position.

Ccdc111 was able to elongate a pre-existing primer, also demonstrating DNA and RNA polymerase activities. Such a duality of ccdc111 as a primase and polymerase, prompted us to modify its name to PrimPol (approved by the HUGO committee). The catalytic residues forming a common active site responsible for both primase and polymerase activities of PrimPol have been identified. PrimPol is a distributive DNA polymerase, that inserts dNTPs by copying a template chain with a moderate fidelity, in spite of the lack of proofreading activity. Moreover, PrimPol tolerates lesions in the template strand as 8oxoG, abasic sites, or thymidine dimers (CPD), to name a few. These results support a role of PrimPol in damage tolerance coupled to DNA replication.

PrimPol has a zinc finger domain at its C-terminus, shown to be crucial for the primase activity. Strikingly, the zinc finger domain is not only dispensable for the polymerase activity of PrimPol, but its deletion does enhance polymerization efficiency by decreasing the K_M for dNTPs.

Subcellular localization analysis showed that PrimPol is present at both nucleus and mitochondria. PrimPol could have an auxiliary role during nuclear DNA replication by Pol ϵ y Pol δ ; and during mitochondrial DNA replication by Pol γ . PrimPol would assist replicative DNA polymerases from both compartments, when they become stalled opposite DNA lesions, by acting as a translesion synthesis polymerase or by synthesizing a new primer near the lesion allowing the progression of the replication fork.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los organismos vivos poseen la información genética almacenada en forma de ácido desoxirribonucleico (DNA). Esta información debe ser transmitida a las células hijas sin ser alterada con el objetivo de mantener la estabilidad genómica. Existen dos procesos fundamentales encargados del mantenimiento y la integridad del genoma: la replicación y la reparación del DNA.

1 Replicación del DNA

La replicación del DNA es un proceso durante el cual una molécula parental de doble cadena de DNA es duplicada en dos moléculas hijas de DNA idénticas cada una de las cuales contiene una hebra de la molécula parental. Este proceso semi-conservativo (Meselson & Stahl 1958), cuya base estructural fue descubierta por Watson y Crick en 1953 (Watson & Crick 1953), transfiere la información genética de un modo fiel a la descendencia.

El proceso general de la replicación del DNA está conservado en todos los organismos vivos, pero los detalles mecanísticos implicados en las funciones e interacciones enzimáticas han divergido entre bacterias y eucariotas. De modo curioso, los organismos del tercer reino de vida, denominadas arqueas, comparten propiedades con procariontes y eucariotas pero la maquinaria de replicación es extremadamente homóloga a la de eucariotas superiores (Liu et al. 2001).

La replicación del DNA implica un gran número de sucesos coordinados que son llevados a cabo por una gran variedad de proteínas. Primero, las proteínas de reconocimiento de los orígenes se unen a los sitios específicos de iniciación de la replicación en el DNA, produciendo su apertura local, y permitiendo que se cargue la helicasa. Una vez ensamblada la maquinaria de iniciación en el origen de replicación, la helicasa abre la doble hélice de DNA, lo que establece la direccionalidad de la horquilla de replicación. La cadena sencilla de DNA resultante actúa como molde para la duplicación del DNA, que comienza habitualmente por la síntesis de un iniciador de RNA, por una primasa. El extremo 3' del iniciador es extendido de forma continua por una DNA polimerasa replicativa, constituyendo la síntesis de la hebra líder, o adelantada. Mientras que la replicación de la cadena líder comienza inmediatamente, la otra cadena sencilla que va siendo expuesta por la acción de la helicasa es cubierta por proteínas (RPA, en eucariotas) para protegerla. Solo cuando hay suficiente DNA de cadena sencilla se puede iniciar la síntesis de DNA en dirección opuesta al progreso de la horquilla de replicación; este proceso se denomina síntesis de la hebra retrasada. La hebra retrasada se replica de un modo discontinuo, pues requiere la repetición frecuente de sucesos de iniciación, elongación y terminación, generándose lo que se conoce como fragmentos de Okazaki. En eucariotas, la iniciación de la síntesis de DNA, tanto en la cadena adelantada como en la cadena retrasada, comienza por la síntesis de un iniciador de RNA por parte de la proteína denominada primasa (en arqueas y eucariotas), y que es rápidamente extendido por una polimerasa replicativa especializada, Pol α , que interacciona muy fuertemente con la primasa. Las primasas muestran alguna especificidad de secuencia, pero sí son muy específicas con la longitud de los iniciadores que sintetizan. Dependiendo del organismo, los iniciadores de RNA son de 3 a 13 nucleótidos, y empiezan con ATP o GTP. En eucariotas, la primasa está fuertemente asociada con Pol α formando un complejo primasa·Pol α que extiende los iniciadores añadiendo 10-20 desoxinucleótidos. Después, el complejo primasa·Pol α transfiere el iniciador a las polimerasas replicativas Pol δ y Pol ϵ . Tanto Pol δ en la hebra retrasada como Pol ϵ en la hebra líder llevan a cabo una elongación muy procesiva gracias a su asociación con el factor de procesividad PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). En la cadena retrasada la rápida transferencia del iniciador a Pol δ permite la liberación del complejo primasa·Pol α , para comenzar la síntesis de un nuevo otro fragmento de Okazaki (Fig. 1).

La elongación mediada por Pol δ continúa hasta que la DNA polimerasa se encuentra con el extremo 5' del anterior fragmento de Okazaki. Para poder unir dos fragmentos de Okazaki debe eliminarse el iniciador de RNA del primer fragmento. En eucariotas la escisión del iniciador de RNA está acoplada con la síntesis del siguiente fragmento de Okazaki. Así, el complejo PCNA·Pol δ desplaza el iniciador, la nucleasa FEN1 escinde el tramo desplazado que es degradado con la ayuda

de la RNasaHII y NDA2 (con actividad helicasa y nucleasa). Una vez eliminado el iniciador de RNA, la unión de los extremos de los fragmentos de Okazaki es llevada a cabo por la DNA ligasa I (DePamphilis & Bell 2010).

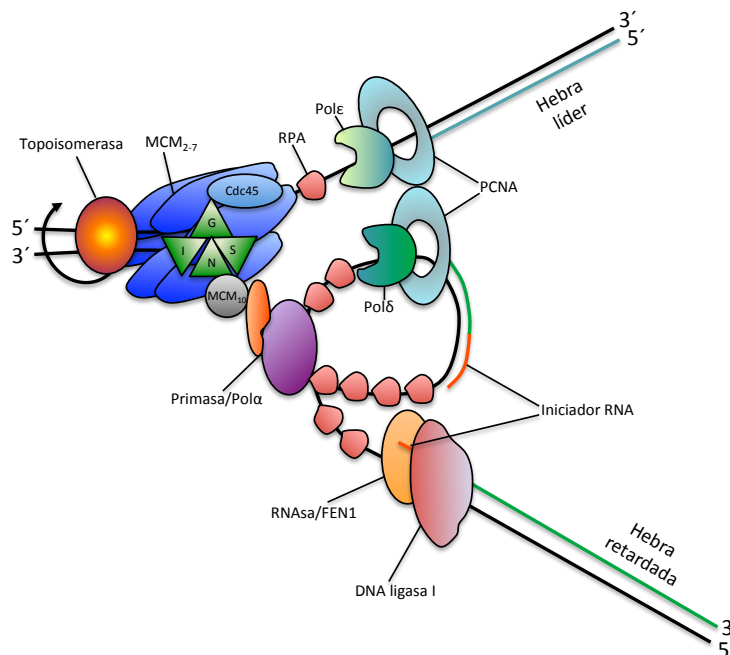


Figura 1. Horquilla de replicación. Se indican los nombres de las proteínas que forman la horquilla de replicación durante el progreso de la misma a lo largo del DNA.

El proceso de la replicación del genoma puede ser diferente en otros organismos, e implicar distintas DNA polimerasas. Sin embargo, todas las DNA polimerasas conocidas requieren de un grupo 3' hidroxilo (iniciador) sobre el que llevar a cabo la transferencia de nucleótidos que permita sintetizar una nueva copia de DNA (Kornberg & Baker 1992; Lodish et al. 1999). La naturaleza ha desarrollado diferentes soluciones para resolver esta necesidad de iniciadores:

- Los retroelementos utilizan un RNAt para primar en la replicación del ADN proporcionando el grupo 3'OH que es elongado por la reversotranscriptasa (Lodish et al. 1999).
- En adenovirus y bacteriófagos de la familia de $\Phi 29$ el grupo hidroxilo es proporcionado por un aminoácido de la proteína terminal (Salas 1991).
- En varias familias de virus de DNA, algunos fagos y plásmidos que realizan la replicación por círculo rodante, una endonucleasa hace un *nick* en una de las hebras. El extremo 5' de la hebra cortada se transfiere a la nucleasa y el grupo 3'OH es elongado por la DNA polimerasa (Ilyina & Koonin 1992; Noirot-Gros & Ehrlich 1996).
- Finalmente, todas las formas celulares y muchos virus, fagos y plásmidos usan una primasa para sintetizar un pequeño iniciador de RNA que provea el grupo 3'OH que será elongado por la DNA polimerasa (Kornberg & Baker 1992).

2 Primasas

Las primasas son enzimas con una función crucial en la replicación y cuya continua actividad es necesaria en la horquilla de replicación. Como definición general se puede decir que las primasas catalizan la síntesis de pequeñas moléculas de RNA que son usadas como iniciadores por las DNA polimerasas. Las primasas pueden ser clasificadas en dos grandes grupos. Un grupo contiene las primasas de bacterias y sus fagos y el segundo engloba a las primasas de arqueas y eucariotas.

2.1 Mecanismo de síntesis del iniciador

Las primasas convencionales catalizan la síntesis de oligorribonucleótidos en un mínimo de cinco pasos: unión al DNA molde, unión de los nucleótidos, iniciación, extensión hasta un iniciador funcional y transferencia del iniciador a la DNA polimerasa. Ha sido propuesto un mecanismo simple en el que la primasa utiliza dos sitios de unión del nucleótido (Frick, Kumar, & Richardson, 1999). En este mecanismo [Fig. 2, (Frick & Richardson, 2001)], el sitio en el que el nucleótido será incorporado al extremo 5' del iniciador es denominado sitio de iniciación, y aquel al que se une el nucleótido que se añadirá al extremo 3' del iniciador, se denomina sitio de elongación. En cada paso de elongación del iniciador, el producto (n+1) formado debe ser transferido al sitio de iniciación de modo que se pueda unir otro NTP en el sitio de elongación. La longitud del oligonucleótido que la proteína puede unir en el sitio de iniciación puede ser la señal para limitar la longitud del oligonucleótido sintetizado por la primasa.

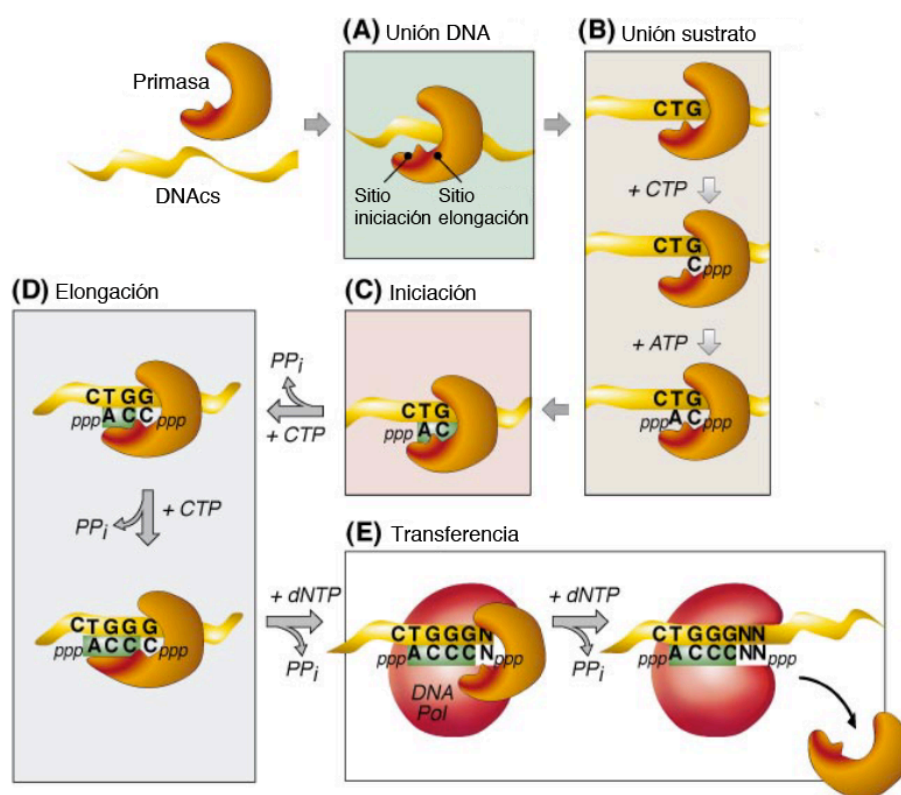


Figura 2. Pasos de la formación del iniciador. Adaptada de Frick y Richardson, 2001. **A.** Unión al DNA. **B.** Unión a los nucleótidos. **C.** Iniciación o formación del dinucleótido. **D.** Elongación del iniciador. **E.** El iniciador es transferido a la polimerasa replicativa.

Una vez que la primasa se haya unido al DNA de cadena sencilla que actuará como molde de la síntesis (Fig. 2A), la primasa debe unir dos NTPs para catalizar la formación de un dinucleótido, liberando un pirofosfato inorgánico. El nucleótido incorporado en el extremo 5' del iniciador es normalmente una purina, ATP o GTP, y mantendrá su trifosfato tras la síntesis de iniciador. La mayoría de las primasas muestran poca preferencia en lo que se refiere al extremo trifosfato del nucleótido incorporado en 5' del iniciador. Por ello, análogos de nucleótido con modificaciones en el grupo 5' fosfato (Frick et al. 1999; Kusakabe & Richardson 1997) e incluso nucleótidos unidos a proteínas mediante su 5' fosfato, pueden ser incorporados en el extremo 5' de los iniciadores (Mustaev & Godson 1995; Godson et al. 1998). Como se muestra en la figura 2B, los dos nucleótidos que forman el dímero son unidos en un orden en particular, uniéndose en primer lugar el nucleótido

del sitio de elongación. La mejor evidencia que apoya este orden de unión de los nucleótidos viene de estudios llevados a cabo con primasas eucarióticas. Como las primasa de eucariotas no inician en sitios muy específicos, sus iniciadores pueden contener tanto ATP como GTP en su extremo 5'. Mediante la identificación del nucleótido en 5' de los iniciadores sintetizados a varias concentraciones de NTPs, Sheaff y Kuchta demostraron que el primer nucleótido que une la primasa aislada de timo de ternera se convierte en el segundo nucleótido del iniciador y determina dónde comienza la síntesis en el molde (Sheaff & Kuchta 1993).

Durante la elongación del iniciador, este debe translocar hacia atrás, para ocupar de nuevo el sitio de iniciación, y dejar hueco para que otro NTP se una al sitio de elongación y subsecuentemente se reciba el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo del oligorribonucleótido (Fig. 2D). La longitud del iniciador sintetizado varía para cada primasa y posiblemente pueda estar regulado por la longitud del oligorribonucleótido que puede ser acomodado en el sitio de iniciación de la enzima. Esta regulación del tamaño del iniciador está correlacionada con el hecho de que las DNA polimerasas requieren un primer de una longitud mínima determinada. De forma colateral, la primasa puede generar tanto "iniciadores abortivos" (de menor tamaño) como iniciadores multímeros (múltiplo del tamaño unitario del iniciador; Suzuki et al. 1989). Los iniciadores multímeros aparecen tanto en reacciones con primasas eucarióticas purificadas, y libres de asociaciones con polimerasas, como en reacciones que contiene el complejo Pola/primasa, pero sin dNTPs. Muchas primasas procarióticas y eucarióticas insertan los nucleótidos con un bajo nivel de fidelidad pudiendo insertar incluso dNTPs, sin embargo, no es una propiedad general de todas las primasas (McMacken & Kornberg 1978; Cotterill et al. 1987; S. K. Johnson et al. 2000).

Para culminar su función como primasas, estas enzimas no solo inician y elongan un oligorribonucleótido sino que también transfieren el iniciador a una DNA polimerasa (Fig. 2E). En sistemas eucarióticos la comunicación entre primasa y polimerasa es más aparente ya que ambas forman un complejo y la primasa transfiere el iniciador a la DNA polimerasa sin disociarse del complejo (Sheaff et al. 1994). En procariotas la interacción entre primasa y polimerasa es más transitoria: la primasa se asocia y se disocia de la horquilla de replicación mientras cataliza múltiples rondas de iniciación (Nakai & Richardson 1988; Yuzhakov et al. 1999).

2.2 Clasificación

Todas las primasas comparten muchas propiedades, pero las dos familias principales (dnaGs y AEPs) se diferencian tanto en su estructura como en sus interacciones con otras proteínas del complejo de replicación. Las primasa procarióticas (del tipo dnaG) se encuentran normalmente asociadas a DNA helicasas replicativas, mientras que las primasas eucarióticas y de arqueas (AEPs) se encuentran formando un complejo con la DNA polimerasa α (Pol α). Esta dicotomía entre las primasas de los linajes bacteriano y arqueo-eucariótico es paralelo a otras enzimas de síntesis de DNA. En particular, la polimerasa replicativa y las encargadas de rellenar huecos en el DNA son muy distintas y también lo son las polimerasas implicadas en la reparación de roturas de doble cadena mediante unión de extremos no homólogos. De forma similar, las helicasas replicativas no son homólogas entre estas dos divisiones primarias de la vida. Sin embargo, otros componentes de la replicación como DNA ligasas, topoisomerasa IA y RNasa HII son homólogos entre bacterias y arqueo-eucariotas (Leipe et al. 1999; Forterre 1999).

2.2.1 Primasas procarióticas

En todas las bacterias y fagos, la primasa encargada de la replicación del DNA, pertenece a la superfamilia DnaG cuyo dominio catalítico presenta un plegamiento TOPRIM. El plegamiento TOPRIM contiene un "core" α/β con cuatro láminas de topología tipo-Rossmann que también se encuentra en los dominios catalíticos de topoisomerasa IA, topoisomerasa II, la familia OLD de nucleasas y proteínas de reparación del DNA relacionadas con RecR (Aravind et al. 1998). En bacterias y fagos las primasas tienen unas características funcionales similares y sus secuencias

aminoacídicas derivan de un ancestro común (Ilyina & Koonin 1992). Estas primasas están compuestas por tres regiones principales: un dominio de unión a zinc (dedo de zinc) en su extremo N-terminal; un sitio de síntesis del oligorribonucleótido; un dominio helicasa o bien una región de interacción con helicasa (Washington et al. 1996). Todas las primasas procarióticas comparten el dedo de zinc N-terminal y el dominio RNA polimerasa pero difieren en su dominio C-terminal (Fig. 3).

El dominio de unión a zinc fue localizado por primera vez en la primasa del fago T7 (Bernstein & Richardson 1988). El análisis de la pérdida del fragmento N-terminal reveló la existencia de un potencial motivo de unión a zinc que, no solamente está presente en las primasas procarióticas, sino también en las eucarióticas y virales (Ilyina & Koonin 1992). Se sabe que la mutación de este dedo de zinc suprime la capacidad de sintetizar iniciadores en la primasa de T7 (Mendelman et al. 1994), pero no así en la dnaG de *Escherichia coli*, aunque resulta ser más sensible a agentes modificantes y la enzima es menos estable (Griep & Lokey 1996). Más recientemente se ha obtenido el cristal del dominio dedo de zinc de la DnaG de *Bacillus stearothermophilus* (Pan & Wigley 2000). Al contrario que otros motivos de unión a zinc, la región de la primasa que coordina el átomo de zinc no posee ninguna hélice α , lo que clasifica al dedo de zinc de las primasas como un “lazo de zinc”, que es una variante de los dominios de unión a zinc. Esta estructura es similar a otras proteínas con lazos de zinc, incluyendo el factor de transcripción TFIIIS (Qian et al. 1993) y la subunidad 9 de la RNA polimerasa II (Wang et al. 1998).

Además del dedo de zinc las primasas procarióticas conservan un dominio central que constituye el core de la actividad primasa. Dentro de esta región se pueden distinguir hasta cinco motivos conservados, 2-6 en la figura 3A. Varios residuos de los motivos 3-6 parecen ser esenciales para la unión al nucleótido y la síntesis del oligorribonucleótido. El motivo 3, cargado positivamente, es similar a un motivo presente en varias subunidades grandes de RNA polimerasas tanto procariotas como eucariotas, y que está implicado en la síntesis de RNA (Mustaev & Godson 1995). Por otro lado los motivos 4, 5 y 6 están implicados en la coordinación del nucleótido y los cationes metálicos divalentes necesarios para la catálisis. El motivo 4 posee un glutámico necesario para la polimerización, mientras que el motivo DxD que coordina el Mg^{2+} se encuentra en el dominio 5 (Aravind et al. 1998). Finalmente el motivo 6 contiene un motivo DxD (para las DnaG bacterianas) o solo una D (para las DnaG de fagos) involucrada igualmente en la coordinación de los iones metálicos necesarios para la catálisis.

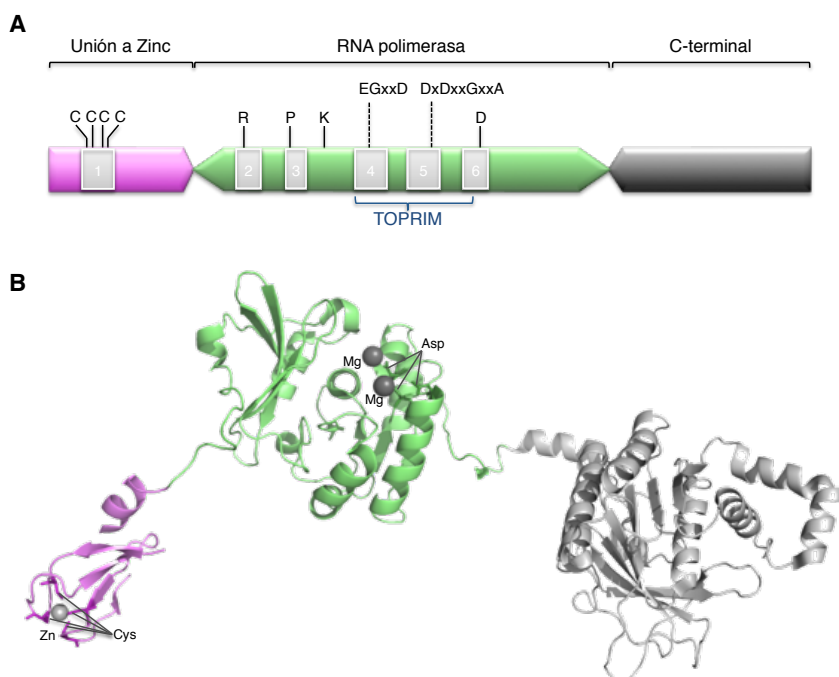


Figura 3. Estructura de una primasa tipo DnaG. **A.** Diagrama esquemático de los dominios estructurales y residuos conservados en la primasa de T7 de la superfamilia DnaG. Las seis secuencias consenso están enumeradas y en cajas grises. Se indica con una llave el dominio TOPRIM. **B.** Se ejemplifica una primasa DnaG con la estructura de la proteína gp4 del bacteriófago T7, donde se observa: el dominio de unión a zinc (violeta) y las cisteínas que lo coordinan; el dominio primasa tipo DnaG (verde), los aspárticos reponsables de la actividad y los metales Mg^{2+} ; el extremo C-terminal que en esta proteína es un dominio helicasa (gris). (PDB, N-terminal 1NUI; PDB, C-terminal 1Q57).

El dominio C-terminal de las primasas procarióticas no está evolutivamente conservado. El extremo C-terminal de la primasa de T7 posee actividad helicasa (Fig. 3B) y está implicado en establecer interacciones con la DNA polimerasa de T7 (Nakai & Richardson 1986). Se sabe menos sobre el dominio C-terminal de las primasas que no poseen actividad helicasa. En las primasas de bacterias y algunas de fagos, la única función conocida para este dominio es que interacciona con helicasas o con otras proteínas de la horquilla de replicación.

2.2.2 Primasas arqueo-eucarióticas

En el linaje arqueo-eucariótico, la estructura de la primasa implicada en replicación posee un plegamiento característico del motivo de reconocimiento del RNA (RRM) (Augustin et al. 2001; Aravind et al. 2002). Un dominio catalítico basado en el plegamiento tipo RRM también está presente en RNA polimerasas dependiente de RNA virales, ciclasas generadoras de nucleótidos cíclicos y DNA polimerasas de las familias A/B/Y involucradas en la replicación y reparación del DNA (Aravind et al. 2002; Kamer & Argos 1984; Poch et al. 1989; Delarue et al. 1990; Murzin 1998; Pei & Grishin 2001; Makarova et al. 2002; Burgers et al. 2001; Braithwaite & Ito 1993).

Mientras que los análisis comparativos de las proteínas que contienen el dominio TOPRIM, típico de las primasas de bacterias, sugieren que estaba ya presente el último ancestro común universal (LUCA); el origen de las primasas arqueo-eucarióticas (AEP) es menos claro. El perfil filético de los miembros de la familia AEP sugieren que no está presente en LUCA y que fue reclutada en la base de la evolución del linaje arqueo-eucariótico con una subsecuente adquisición por las bacterias mediante transferencia horizontal de genes (Iyer et al. 2005).

El “core” compartido por todas las AEPs contiene dos módulos estructurales sucesivos. El módulo N-terminal no tiene equivalente estructural, mientras que el módulo C-terminal contiene el dominio tipo RRM previamente definido y que también se encuentra en el dominio palma de otras polimerasas. Estos dos módulos definen el core característico de las primasas de la superfamilia arqueo-eucariota y se encuentran apilados uno sobre otro, permaneciendo los residuos del centro activo en el espacio entre estos dos módulos. Existen tres motivos proteicos conservados a lo largo de toda la superfamilia de las AEP, el motivo hhhDhD (h, es un residuo hidrófobo), el motivo sxH (s, es un residuo pequeño), y el motivo hD/E (“D/E”, es un residuo ácido). La mutagénesis dirigida ha demostrado que el motivo DxH está involucrado en la interacción con el metal (Lipps et al. 2004; Lao-Sirieix & Bell 2004). Esto sugiere, que como en otras polimerasas, el metal es crucial para la actividad catalítica del enzima. El primer aspártico del motivo DxH, la histidina del segundo motivo y el aspártico del tercero se encuentran situados al mismo nivel en el centro del dominio RRM, lo que sugiere que participan conjuntamente en la catálisis.

Clasificación de la superfamilia AEP

En base a la similitud de secuencia las primasas arqueo-eucarióticas se pueden clasificar en tres grandes clados (Fig.4):

- *Clado de AEPs propiamente dichas.* Este clado engloba a tres familias, la subunidad pequeña de las primasas clásicas AEP las primasas de baculovirus tipo Lef-1, y las primasas de reunión de extremos no homólogos (NHEJ) bacterianas. Las AEP clásicas y las tipo Lef-1 se encuentran formando un complejo funcional con su respectiva subunidad grande, no catalítica. Esta segunda subunidad regula la actividad de la subunidad pequeña y al unión la DNA ayudando a contar la longitud de los

iniciadores de RNA sintetizados para generar iniciadores de una longitud definida. Se ha demostrado que el dominio tipo Pol β presente en la subunidad grande es responsable de este mecanismo de conteo (Zerbe & Kuchta 2002). El iniciador de RNA es posteriormente transferido a la Pol α que lo elongará, para a su vez transferir este iniciador híbrido RNA-DNA a las polimerasas replicativas Pol δ y Pol ϵ . Estas primasas contienen, de forma similar a las bacterianas, un dominio de unión a zinc. En este caso el dedo de zinc, de menor tamaño, se encuentra situado en la parte central de la proteína y el átomo se encuentra coordinado por cuatro cisteínas (Ito et al. 2003).

Dentro de este clado se encuentran también las primasas bacterianas especializadas en NHEJ. La mayoría de estas primasas están fusionadas a una DNA ligasa y una nucleasa localizada en el extremo N-terminal del dominio primasa. El patrón de distribución filético de este sistema, con representantes presentes en bacterias filogenéticamente distantes sugiere que ha sido diseminado por transferencia genética horizontal (Koonin et al. 2000; Aravind & Koonin 2001). Este es un caso especial de primasas que han perdido la capacidad de iniciar la síntesis *de novo* para especializarse en procesar los extremos de una doble rotura de DNA, y así contribuir a un sistema de NHEJ en procariotas. Además estructuralmente tienen una gran diferencia con el resto de primasas y es que carecen de estructuras tipo dedo de zinc (Pitcher et al. 2007).

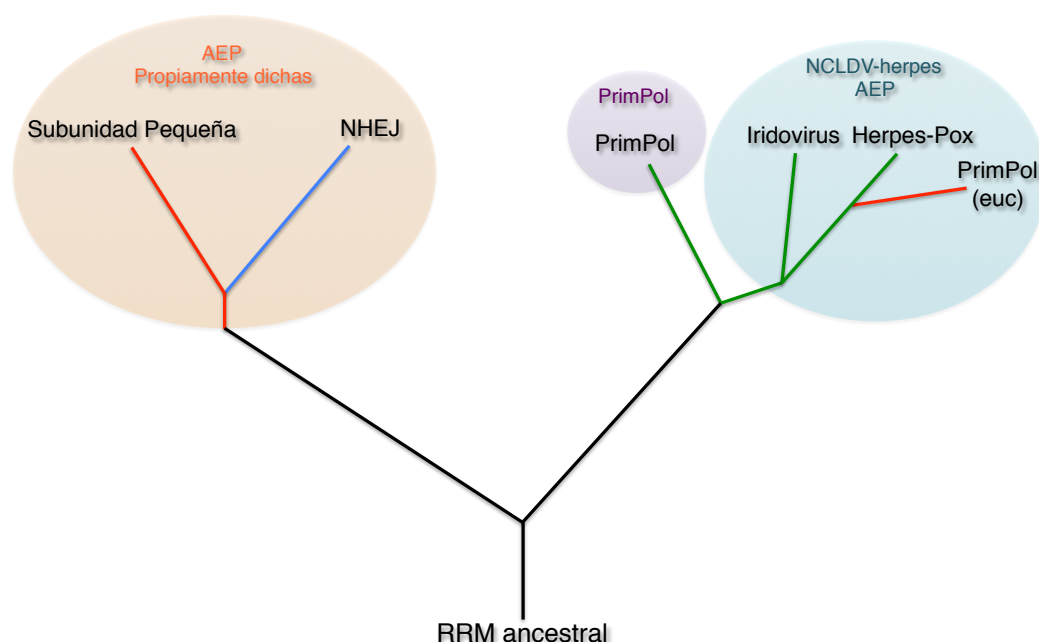


Figura 4. Evolución de las primasas de la superfamilia AEP. Las ramas de arqueas y eucariotas (incluyendo algunos virus) se muestran en rojo, las pertenecientes a bacterias en azul y ramas que incluyen proteínas de plásmidos, fagos y otros elementos móviles están coloreadas en verdes. Las ramas ancestrales se presentan en negro. Se indican los tres clados de primasas rodeando a los miembros que incluyen.

· *Clado tipo PrimPol.* Este clado incluye primasas en un amplio rango de bacterias, bacteriófagos, plásmidos y arqueas. Las proteínas de este clado poseen frecuentemente dos dominios denominados primasa C-terminal 1 y 2 (PriCT-1, PriCT-2). En base a la presencia de residuos conservados, la arquitectura de los dominios y el contexto genómico, se pueden distinguir hasta siete familias dentro de este clado de PrimPol. Existe una gran expansión de estas primasas a lo largo de los géneros *Streptomyces* y *Clostridium*, aunque gran parte de estas proteínas presentan mutaciones puntuales que las hacen potencialmente inactivas. Esta abundancia de versiones aparentemente inactivas son reminiscencias de transposasas inactivadas. Las PrimPols podrían actuar como primasas y, posiblemente, como DNA polimerasas durante la transposición replicativa de estos elementos móviles.

De la funcionalidad y actividad de este nuevo clado de AEPs poco se conoce, solo existen dos ejemplos de proteínas que contienen el dominio PrimPol que han sido caracterizadas bioquímicamente. El primer caso se trata de una proteína presente en el plásmido pRN1 de la arquea *Sulfolobus islandicus*, y cuyo gen (ORF904) codifica para una proteína que contiene el dominio PrimPol y una helicasa asociada. El análisis de la actividad primasa-polimerasa de esta proteína permitió concluir que sintetiza un iniciador compuesto por un solo ribonucleótido y una región de aproximadamente siete desorribonucleótidos y posee una alta especificidad de secuencia para la iniciación de la síntesis (Beck & Lipps 2007). La estructura del dominio PrimPol del ORF904 no presenta parecido con ninguna estructura de DNA polimerasa conocida. El dominio presenta una depresión cóncava en la que se encuentran residuos esenciales para las actividades primasa y polimerasa lo que indica que esta depresión en la proteína forma el centro activo. Entre los extremos N y C-terminal del dominio se encuentra una estructura dedo de zinc que espacialmente queda próxima al centro activo de la proteína (Lipps et al. 2004). Más recientemente, en el corinofago BFK20 se ha localizado un dominio PrimPol en el extremo N-terminal de la proteína gp34 (Halgasova et al. 2012). Esta gp34N posee actividad primasa y polimerasa, prefiriendo sintetizar los iniciadores a partir de desoxirribonucleótidos.

· *Clado de las primasas de NCLDV-herpesvirus*. Los miembros de esta familia se encuentran en grandes virus DNA nucleo-citoplasmáticos (NCLDV), herpesvirus, kinetoplastidos, y una nueva familia de primasas eucarióticas a la que pertenece el miembro humano caracterizado en la presente tesis. Las características comunes para este clado son la presencia de dos residuos altamente conservados: un glutamato, presente en un motivo Exb (b, residuo grande, en su mayoría hidrofóbico) y una lisina presente en el giro entre dos hebras. La superposición de estos residuos conservados con las estructuras disponibles de proteínas de la superfamilia AEP sugieren que la lisina y el glutamato conservados se localizan cerca del sitio activo de la proteína y podrían tener una función en la interacción con el sustrato como a la unión del nucleótido. Basado en la organización estructural de los dominios este clado se puede dividir en dos familias, la familia de las primasas de los iridovirus y la de los herpes-poxvirus.

La familia de primasas de iridovirus se caracteriza por tener un dominio PriCT-2 en el extremo C-terminal. Los miembros de esta familia incluyen a los iridovirus, mimivirus y *Leishmania*. Algunas de ellas poseen dominios helicasa o asociaciones funcionales con estas enzimas.

La familia de las primasas de herpes-poxvirus se caracteriza por la presencia de un dominio rico en hélices β en el extremo C-terminal de la proteína en lugar del PriCT-2. En la mayoría de proteínas de esta familia, esta región posee unas cisteínas e histidinas conservadas y su patrón de estructura secundaria parece un dedo de zinc. Algunos miembros de esta familia presentan asociaciones con ATPasas y helicasas.

Una tercera familia se establece con el descubrimiento de la existencia de una segunda primasa en células humanas. En un principio denominada Eukprim2 (Iyer et al. 2005), y posteriormente PrimPol (esta Tesis), debido a sus características enzimáticas, se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de los reinos de hongos, animales y plantas. El gen de esta nueva primasa parece haber sido adquirido de manera temprana en la evolución eucariota, aunque posteriormente se perdió en varias ocasiones en el reino de hongos y animales, como en levaduras, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*.

3 DNA polimerasas

Las DNA polimerasas son esenciales tanto para el mantenimiento de la integridad del genoma como para su duplicación. Por ello, no es sorprendente que desde organismos sencillos como bacterias hasta eucariotas superiores posean diferentes DNA polimerasas, involucradas en replicación, reparación del DNA o para permitir que la síntesis continúe a través de varios tipos de

daño en el DNA que bloquean la progresión de la horquilla de replicación. Lo que tienen todas en común es el hecho de que ninguna de ellas puede iniciar la síntesis *de novo*: las DNA polimerasas solo pueden extender DNA desde un iniciador que proporcione un grupo hidroxilo libre que se encuentra hibridado a un molde. Excepcionalmente, la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), cataliza la adición de ribo- o desoxiribonucleótidos al extremo 3' de un DNA en ausencia de molde. La telomerasa, una DNA polimerasa que evita el acortamiento progresivo de los extremos de los cromosomas lineales, fue inicialmente considerada una nucleotidil transferasa terminal, porque extiende un extremo 3'OH en ausencia de un molde de DNA. Sin embargo, es una reverso-transcriptasa, que está provista de su propio molde de RNA como componente de la enzima (Shippen-Lentz & Blackburn 1990).

3.1 Estructura y mecanismo común para las DNA polimerasas

Estudios cristalográficos han revelado que las subunidades catalíticas de todas las polimerasas comparten tres dominios, llamados, “dedos”, “palma” y “pulgar” (Fig. 5A). Estos tres dominios forman una cavidad en cuyo fondo se encuentra el dominio palma, que alberga los tres residuos catalíticos que coordinan los dos iones metálicos divalentes. Los dedos están implicados en la unión al nucleótido entrante y al molde de DNA, mientras que el dominio pulgar sujeta la doble hélice de DNA que está emergiendo del sitio activo de la proteína. Aunque existen varias familias filogenéticas distintas de DNA polimerasas, esta topología tipo “mano” es común a todas las DNA polimerasas (Ollis et al. 1985).

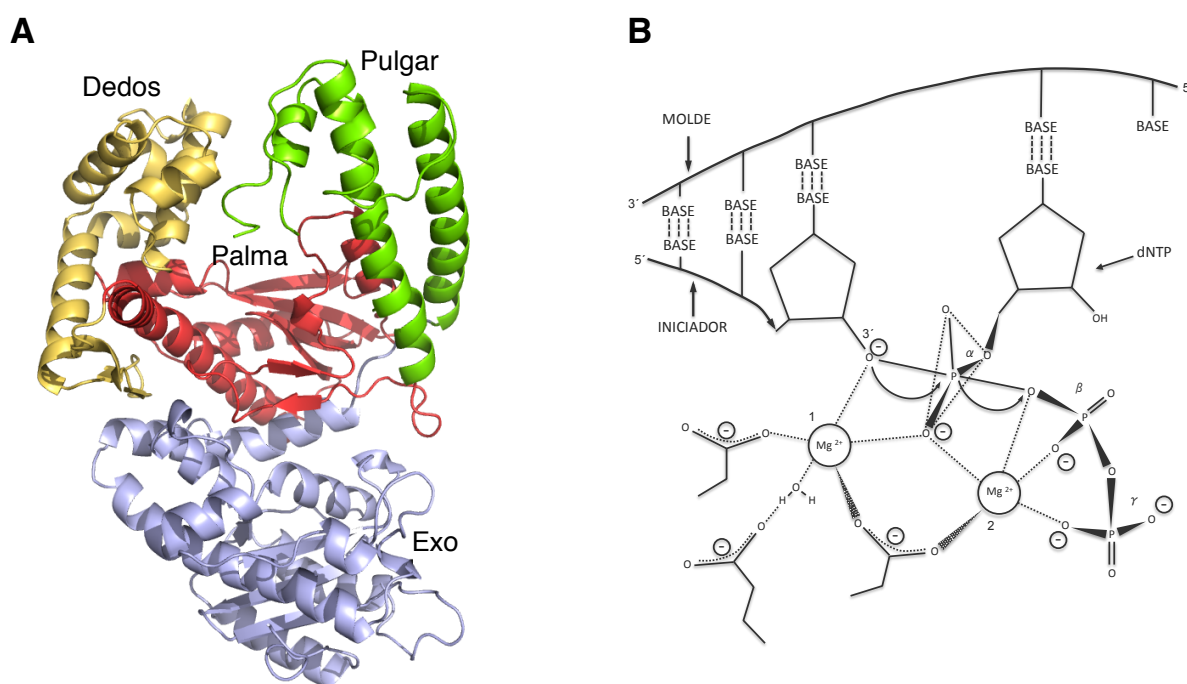


Figura 5. Estructura y mecanismo común de las DNA polimerasas. **A.** Dominios estructurales de las DNA polimerasas. En la DNA polimerasa I de *E. coli* (PDB 1KSP) se ejemplifica la estructura típica tipo “mano derecha” de las DNA polimerasas; en amarillo se muestra el dominio dedos, en rojo la palma y en verde el pulgar, además esta proteína posee un dominio 3'-5' exonucleasa (mostrado en gris-azul). **B.** Estado de transición del mecanismo de dos iones metálicos para la reacción polimerasa. El sitio activo presenta los dos metales que estabilizan el estado de transición. El ión Mg^{2+} 1 activa el grupo 3'-OH del iniciador para atacar al fosfato α del dNTP. El ión Mg^{2+} 2 tiene un doble papel en estabilizar la carga negativa que se acumula en el oxígeno y la que deja la quelación de los fosfatos β y γ .

Otra característica común a todas las DNA polimerasa es el uso de dos metales divalentes para mediar la catálisis (Fig. 5B). El ión metálico A establece interacciones con el grupo OH del extremo 3' de la cadena naciente de DNA. Esta interacción facilita el ataque del grupo hidroxilo al fosfato α del dNTP entrante. Ambos iones metálicos ayudan a estabilizar el intermedio que ocurre durante la formación del enlace fosfodiéster. La catálisis ocurre mediante una reacción química tipo SN_2 donde el fosfato α pasa por un estado de transición que implica establecer cinco uniones diferentes. En el paso final de la reacción el metal B facilita la salida del pirofosfato liberado durante la formación del enlace fosfodiéster (Steitz & Steitz 1993). Un trabajo reciente pone de manifiesto la posible intervención de un tercer metal en la catálisis, probablemente estabilizando el estado de transición y facilitando la liberación del producto (Nakamura et al. 2012).

4 Papel de las DNA polimerasas eucariotas en mecanismos de mantenimiento del genoma

En base a su similitud de secuencia aminoacídica las DNA polimerasas eucarióticas pertenecen a 4 familias diferentes: A, B, X e Y (ver Tabla 1). La familia A, cuyo miembro más característico es la PolI de *E. coli*, incluye tres DNA polimerasas eucarióticas: Pol γ , la polimerasa replicativa del genoma mitocondrial, Pol θ y Polv. La familia B contiene las principales polimerasas replicativas eucarióticas (Pol α , Pol δ , Pol ϵ), y la DNA polimerasa de translesión Pol ζ . La familia X está formada por las DNA polimerasas Pol β , Pol λ , Pol μ , implicadas en reparación, y la TdT, implicada en generación de variabilidad en el sistema inmune. Por último, la familia Y está formada por las DNA polimerasas Pol η , Poli, Polk, y Rev1, implicadas en la síntesis a través de lesiones.

Familia	Denominación HUGO	Denominación griega	3'-5' exonucleasa	Otras actividades	Función propuesta
A	POLG	Pol γ	+	5'exo	Replicación/ reparación mtDNA
A	POLQ	Pol θ	+	dRPiase	TLS/ SHM
A	POLN	Polv	-	ATPasa, helicasa	TLS
B	POLA	Pol α	-		Replicación nuclear/ HR
B	POLD1	Pol δ	+		Replicación nuclear/ HR/ NER/ MMR
B	POLE	Pol ϵ	+		Replicación nuclear/ HR/ NER/ MMR
B	POLZ	Pol ζ	-		TLS
X	POLB	Pol β	-	dRPiase APiase	BER
X	POLL	Pol λ	-	dRPiase	Meiosis/ BER/ NHEJ/ V(D)J
X	POLM	Pol μ	-	TdT	NHEJ/ SHM/ V(D)J
X	TdT	TdT	-		V(D)J
Y	POLH	Pol η	-		TLS
Y	POLI	Poli	-	dRPiase	TLS
Y	POLK	Polk	-		TLS
Y	REV1	Rev1	-		TLS

Tabla 1. Familias de DNA polimerasas humanas. TLS: Síntesis a través de lesiones. SHM: Hipermutación somática. HR: Recombinación homóloga. NER: Reparación por escisión de nucleótido. MMR: Reparación de apareamientos erróneos. BER: Reparación por escisión de base. NHJ: Reunión de extremo no homólogos.

4.1 Replicación del genoma nuclear

En el proceso de replicación del genoma nuclear de eucariotas explicado anteriormente intervienen tres DNA polimerasas: α , δ y ϵ ; todas ellas pertenecen a la familia B de DNA polimerasas. La subunidad catalítica de Pol α no es altamente procesiva y carece de actividad correctora de errores, exonucleasa 3'-5'. Esta polimerasa se encuentra asociada al inicio de la síntesis de la cadena adelantada, y de cada fragmento de Okazaki de la hebra retardada, formando el complejo Pol α /primasa, (revisado en Bebenek & Kunkel 2003). Este complejo se encuentra formado por la subunidad catalítica de la primasa (Pri1), su subunidad accesoria (Pri2), la subunidad catalítica Pol α y su subunidad accesoria. Pol α extiende el iniciador de RNA sintetizado por la primasa para convertirlo en un iniciador de DNA que podrá ser elongado por Pol δ o Pol ϵ .

Pol ϵ extiende el extremo 3' de la cadena naciente de la hebra líder mientras que Pol δ extiende los fragmentos de Okazaki de la hebra retrasada. Las DNA polimerasas δ y ϵ humanas están formadas por cuatro subunidades donde la actividad catalítica se encuentra en la de mayor tamaño. Tanto Pol δ como Pol ϵ realizan una síntesis muy fiel ya que poseen actividad 3'-5' exonucleasa, y ambas interaccionan con el complejo PCNA y sintetizan el DNA de forma procesiva.

4.2 Replicación y mantenimiento del genoma mitocondrial

La mitocondria posee una maquinaria enzimática única dedicada exclusivamente a la replicación del DNA mitocondrial. Muchos componentes básicos de este sistema han sido caracterizados pero algunas actividades enzimáticas no han sido todavía identificadas, como por ejemplo, la primasa de la síntesis de DNA de la hebra retrasada. Incluso hay un intenso debate sobre el modo exacto en el que se replica el DNA mitocondrial (mtDNA).

La mitocondria posee un DNA circular de doble cadena de unas 16,6 kb (en humanos) que codifica para 13 proteínas de las ≈ 90 presentes en la cadena respiratoria, dos RNA ribosomales y 22 RNA de transferencia. A las cadenas individuales de las moléculas de mtDNA se les denomina cadena pesada (H) y cadena ligera (L) por su diferencia de densidad ya que la hebra H es más rica en guaninas que la L (Fig. 6A).

Los primeros estudios de la replicación del mtDNA en líneas celulares de mamíferos dieron lugar a definir el modelo de replicación asimétrica (Clayton 1991). En este modelo, la transcripción (por la RNA polimerasa mitocondrial) desde el promotor de la cadena ligera (LSP) proporciona el iniciador de RNA necesario para la replicación de la cadena pesada. La síntesis de DNA desde el origen O_H es unidireccional y progresa desplazando la cadena pesada parental. Cuando la síntesis de la hebra líder ha alcanzado tres cuartos de la longitud del genoma, queda expuesto otro origen principal de replicación, el origen de replicación de la cadena ligera (O_L), que es activado, y la síntesis de la hebra retrasada se inicia en dirección opuesta. Más recientemente se ha propuesto un modelo diferente de replicación del mtDNA, ya que se han observados fragmentos de DNA correspondientes a una síntesis de la hebra líder y retrasada clásica, de forma sincrónica, entre los orígenes O_H y O_L (Holt et al. 2000). Estas observaciones llevaron a concluir que el mtDNA se replica de forma simétrica, donde la síntesis de la hebra líder y retradada progresa desde múltiples horquillas de replicación de forma bidireccional. Finalmente, se han hallado evidencias que podrían conciliar ambos modelos de replicación, ya que el modo en el que este DNA se replica parece que puede cambiar según se trate de un mantenimiento en estado estacionario (modelo asimétrico) o una síntesis acelerada como respuesta a demandas fisiológicas (modelo simétrico) (Fig. 6B).

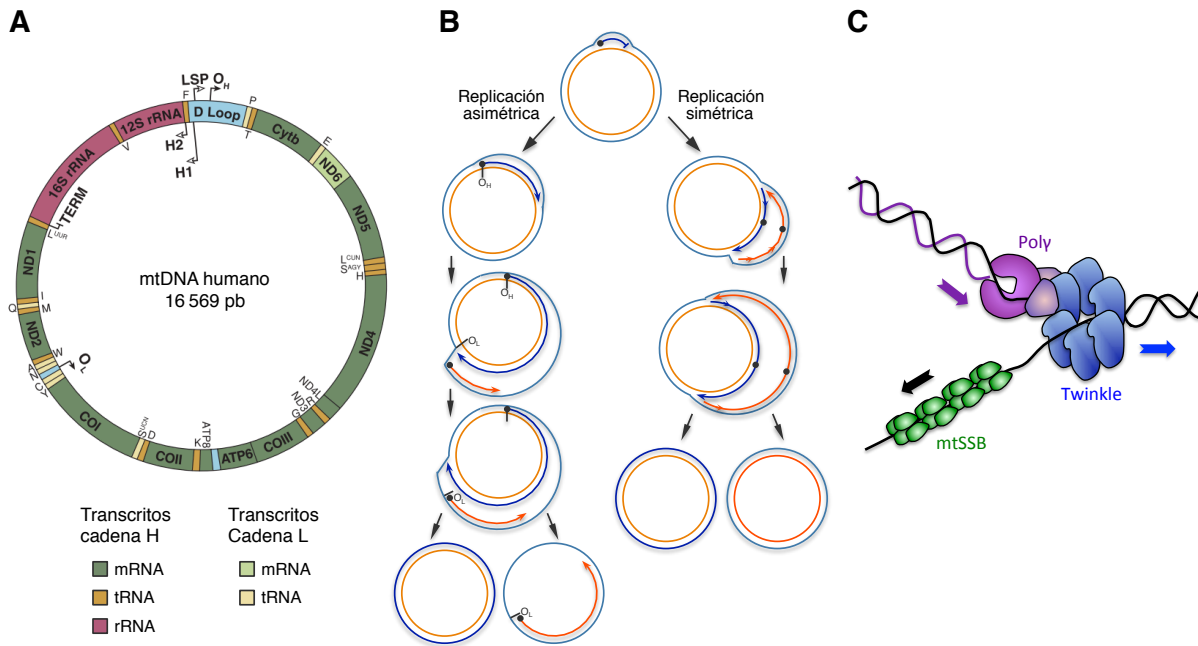


Figura 6. Replicación mitocondrial. **A.** Genoma mitocondrial humano y transcritos que codifican sus dos cadenas. **B.** Modelos de replicación del DNA mitocondrial, asimétrica y simétrica. **C.** Representación de la horquilla de replicación del DNA mitocondrial, donde se indican las principales proteínas involucradas en el proceso. Figuras adaptadas de Falkenberg et al., 2007.

La única polimerasa conocida hasta la fecha que se encuentra en la mitocondria, y por tanto encargada de la replicación y el mantenimiento del DNA mitocondrial, es Poly (Kaguni 2004). Esta polimerasa presenta homología con la DNA polimerasa del fago T7. Además de poseer actividad 5´-3´ polimerasa, esta proteína tiene actividad 3´-5´ exonucleasa implicada en la corrección de errores, y es capaz además de realizar la escisión de un residuo 5´-desoxirribosa fosfato (dRP liasa), por lo que puede participar en reparación de DNA por BER. Poly es una enzima heterotrimérica formado por una subunidad catalítica (PolyA) asociada a otra subunidad (PolyB) que aumenta la afinidad de unión al DNA, estimula la actividad polimerasa y exonucleasa, y aumenta la procesividad de la enzima (Carrodeguas et al. 2001; Lim et al. 1999) (Fig. 6C).

4.3 Reparación

La copia completa y precisa es esencial para el mantenimiento de la integridad del genoma. Para ello la reparación previa del DNA es un requisito para proveer de sustratos limpios a la horquilla de replicación. El metabolismo celular normal como la exposición de la célula a agentes exógenos, producen daños en el DNA como pérdida o modificación de bases, roturas en el DNA y uniones intra- e intercatenarias. Existen múltiples vías de reparación del DNA, cuya acción depende del tipo de daño causado. De igual modo los sustratos de DNA generados en cada tipo de lesión son diferentes, de modo que existen DNA polimerasas especializadas en las diferentes rutas de reparación (Fig. 7).

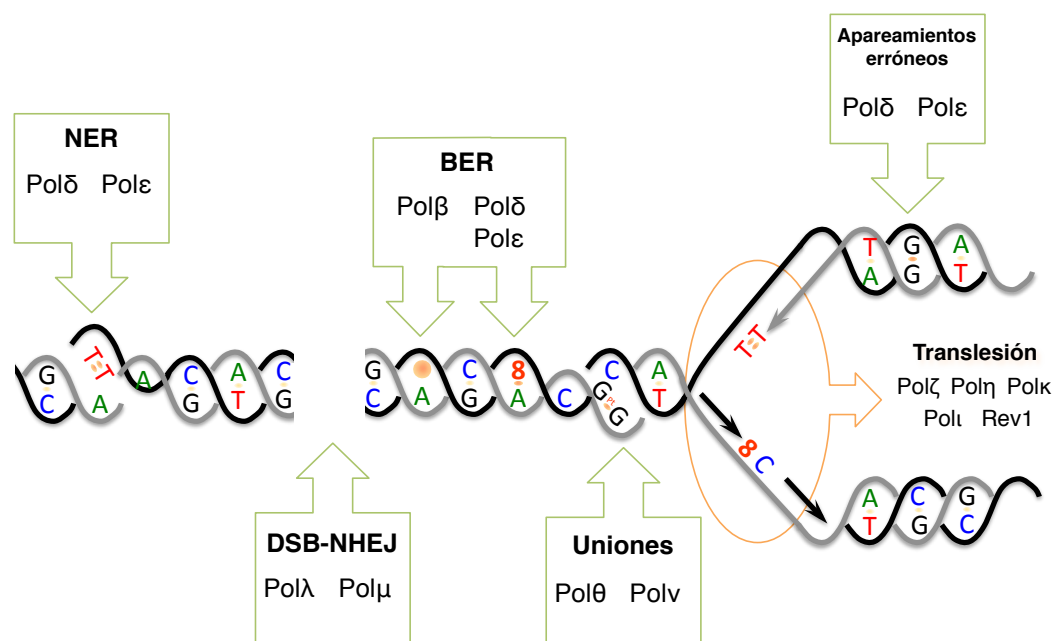


Figura 7. Posibles daños presentes en el DNA. Se ejemplifican varias lesiones presentes en el DNA así como las principales DNA polimerasa encargadas de su reparación (verde) o tolerancia durante el avance de la horquilla de replicación (naranja).

4.3.1 Reparación por escisión de nucleótido (NER)

Existe una variedad de lesiones que normalmente implican una gran distorsión de la doble hélice, incluyendo el daño inducido por la radiación ultravioleta (UV) y aductos químicos, que son eliminados mediante la escisión del nucleótido. Esta ruta de reparación implica varios pasos, reconocimiento de la lesión, desenrollado de la zona que contiene el daño, incisión en ambos lados de la lesión para escindir un oligómero, re-síntesis del hueco (*gap*) y ligación. En eucariotas este hueco suele ser de ≈ 30 nucleótidos y puede ser rellenado por las DNA polimerasas de la familia B, Polδ o Polε.

4.3.2 Reparación por escisión de base (BER)

Este proceso tiene lugar cuando las bases se pierden por deprinación o depirimidinación, cuando son modificadas por alquilación, oxidación o deaminación, y cuando bases anormales (como dUTP, 8oxodGTP) son insertadas en el DNA. El BER es iniciado por una DNA glicosilasa, que reconoce la base dañada y la elimina dejando un sitio abásico. Una AP endonucleasa corta en el sitio abásico para dejar un *nick* con un 3'OH y un dRP (desoxirribose fosfato) en el extremo 5'. Alternativamente, el BER puede comenzar con la acción de una DNA glicosilasa con actividad AP liasa, de modo que deja un hueco de un nucleótido con un 3'OH y un 5'fosfato. En mamíferos es Polβ quien incorpora un nucleótido en el 3'OH y luego elimina el residuo dRP con su actividad dRP liasa. El *nick* resultante es sellado por una DNA ligasa completando el BER de trecho corto. Si el residuo dRP es modificado o no es eliminado por Polβ, la síntesis con desplazamiento de banda puede generar un DNA de 2-13 nucleótidos de cadena sencilla que es eliminado por la endonucleasa FEN1. Las DNA polimerasas implicadas en este BER de trecho largo incluyen a Polβ, Polδ y Polε (Dogliotti et al. 2001).

Polβ pertenece a la familia X (Fig. 8) de polimerasas junto con Polλ, Polμ y TdT. Estas enzimas están implicados en la reparación del DNA, y en la creación de variabilidad génica. Polβ es la polimerasa eucariótica más pequeña, y está compuesta por un solo polipéptido de 39 kDa (revisado en Wilson 1998). Polβ está compuesta por dos dominios: 8 kDa en el extremo N-terminal (que posee la actividad dRP liasa y la capacidad de unión a DNA de cadena sencilla) y el core de la actividad polimerasa, que reside en el dominio C terminal. Polβ es capaz de rellenar un hueco de 1 nt en el

DNA, capacidad estimulada por la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' (Singhal & Wilson 1993).

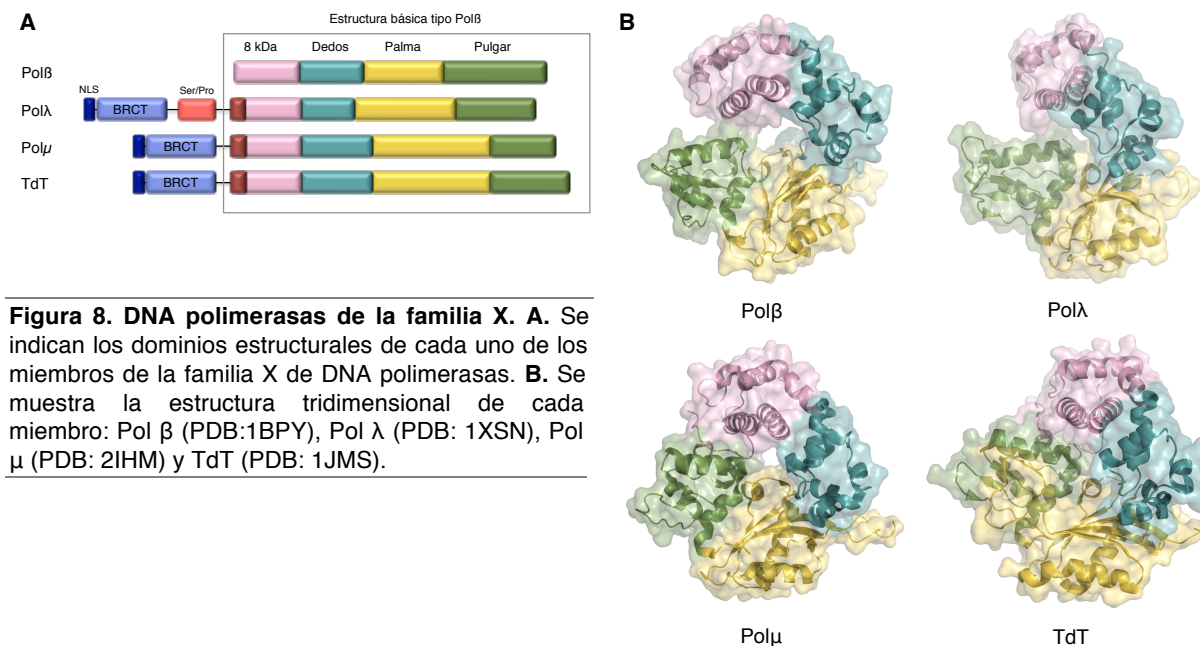


Figura 8. DNA polimerasas de la familia X. **A.** Se indican los dominios estructurales de cada uno de los miembros de la familia X de DNA polimerasas. **B.** Se muestra la estructura tridimensional de cada miembro: Pol β (PDB: 1BPY), Pol λ (PDB: 1XSN), Pol μ (PDB: 2IHM) y TdT (PDB: 1JMS).

Al igual que Polβ, Polλ, Polμ y Polγ también poseen actividad dRP liasa. DNA Polλ, como miembro de la familia X, comparte muchas características con Polβ; tienen una organización de dominios proteicos y una estructura similar, ambas tienen actividad dRP liasa, carecen de actividad 3'-5' exonucleasa y aumentan su procesividad en un *gap* con un grupo 5' fosfato (García-Díaz et al. 2001, 2002). Polμ, como miembro de la familia Y, ha sido implicada en el paso de lesiones que bloquean la horquilla de replicación pero algunas de sus propiedades son concluyentes con una función en BER (Bebenek et al. 2001). Por último, la actividad dRP liasa de Polγ (Longley et al. 1998) será la responsable del BER en la mitocondria causado por el daño oxidativo resultante de las especies reactivas de oxígeno generadas durante la fosforilación oxidativa.

4.3.3 Reparación de uniones intra- o intercatenarias del DNA

Las uniones intra- o intercatenarias son lesiones altamente citotóxicas causadas por agentes como el gas nitrógeno, el psoraleno, el diepoxibutano y el cisplatino. Recientes polimerasas identificadas, de la familia A, Polθ (Seki et al. 2003; Sharief et al. 1999) y Polv (Marini et al. 2003) han sido implicadas en la reparación de este tipo de daños en el DNA. Polθ tiene un dominio polimerasa fusionado a una helicasa; además, se ha sugerido que Polθ incorpora dG frente a dT con mayor facilidad que los miembros de la familia A de polimerasas. Ambas, Polθ y Polv, son enzimas con una procesividad más parecida a las polimerasas replicativas de la familia B.

4.3.4 Reparación de roturas de doble cadena

Las roturas de DNA de doble cadena (DSB) son particularmente peligrosas para la célula ya que pueden dar lugar a pérdida de información genética, muerte celular o reordenamientos cromosómicos (traslocaciones, inversiones, deleciones) que desemboquen en tumorigénesis (Mills et al. 2003). Estas roturas pueden ocurrir durante procesos fisiológicos como la replicación o la meiosis, por radiación ionizante (Morgan et al. 1996) o como consecuencia del metabolismo celular (Karanjawala et al. 2002). Estas lesiones en el DNA pueden repararse mediante dos procesos: la recombinación homóloga (HR), que se da al final de la fase S y en G2, o mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Fig. 9), que ocurre durante todo el ciclo celular (Takata et al. 1998; Lieber 2008).

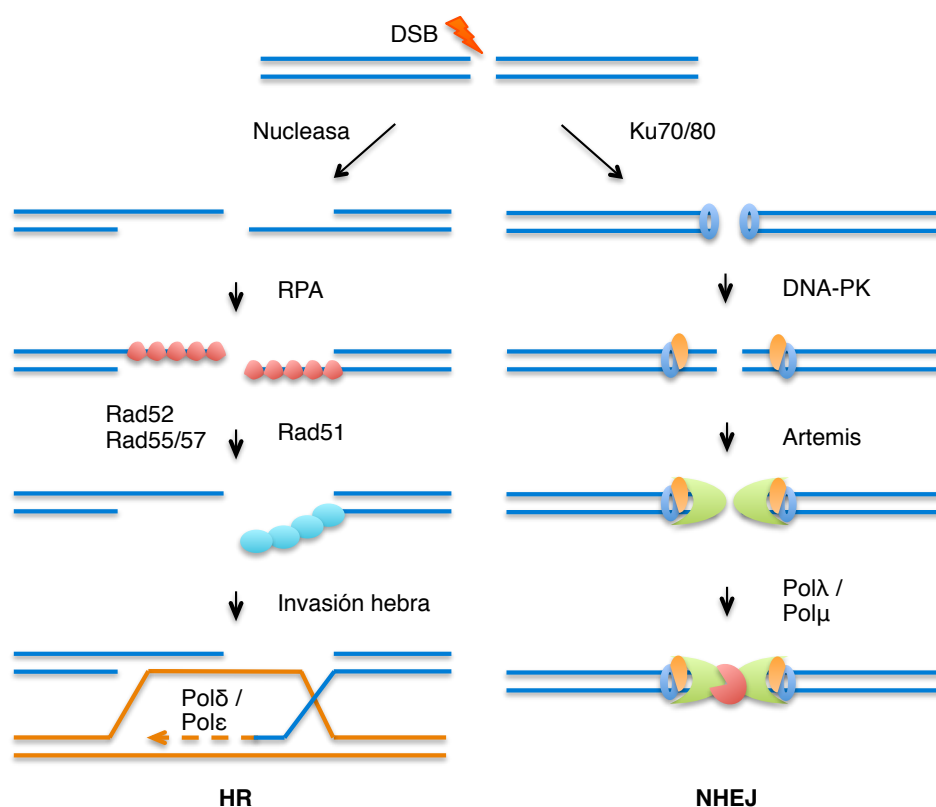


Figura 9. Reparación de una rotura de doble cadena en el DNA. Se pueden llevar a cabo dos rutas diferentes para reparar este tipo de daño en el DNA: mediante la recombinación homóloga (HR) que es un proceso libre de errores, o mediante la reunión de extremos no homólogos (NHEJ) proceso propenso al error.

- *Recombinación homóloga (HR).* Este sistema de reparación requiere que se procesen los extremos 5' por una exonucleasa 5'-3', lo que generará extremos 3' protuberantes. A ellos se unirá la proteína replicativa A (RPA) que elimina su estructura secundaria y permite que se unan las proteínas Rad51, Rad52, Rad 55 y Rad 57 formando un filamento nucleoproteico. Rad51 ayuda a la interacción con otra molécula de DNA y promueve la invasión de la cromátida y la síntesis más allá del sitio de rotura. Este es un mecanismo fiel de reparación.

- *Unión de extremos no homólogos (NHEJ).* El primer paso es el reconocimiento de la rotura por el heterodímero Ku70/Ku80, que rodea el dúplex el DNA impidiendo su degradación (Walker et al. 2001). A continuación, la DNA-PK se une a ambos lados (Gottlieb & Jackson 1993), favoreciendo la unión de ambos extremos de la rotura mediante interacciones proteína-proteína. En la mayoría de los casos, los extremos no pueden ser unidos directamente, sino que deben ser procesados. Las conexiones de los extremos frecuentemente dejan pequeños gaps que deben ser rellenados por DNA polimerasas. Las DNA polimerasas Polμ y Polλ, de la Familia X, participan en este proceso (Ma et al. 2002; Lee et al. 2003). Tanto Polμ como Polλ poseen un dominio BRCT mediante el que interaccionan con la maquinaria de NHEJ. Polμ es capaz de sintetizar a través de extremos no complementarios, mientras que Polλ requiere complementariedad de secuencia (Ramsden 2011). Polμ además tiene una gran capacidad para insertar ribonucleótidos (Ruiz et al. 2003) y posee actividad desoxinucleotidil transferasa terminal (Dominguez et al. 2000; Juárez et al. 2006).

4.3.5 Reparación de apareamientos erróneos

Los errores de polimerización que escapan de la actividad correctora de errores pueden ser reparados en un proceso post-replicativo. Esta ruta de reparación reconoce los pares incorrectos así como adiciones o deleciones. Su reparación implica la escisión de una región de la hebra de DNA recientemente sintetizada que contiene el error, seguida de una síntesis fiel de DNA. Se ha sugerido que la actividad exonucleasa de Pol δ y Pol ϵ puede estar involucrada en el paso de escisión (Longley et al. 1997). El apareamiento erróneo se puede deber a un daño en el DNA, un par G·U y G·T se pueden generar por deaminación de la citosina y 5-metil citosina respectivamente. En este caso la reparación del apareamiento incorrecto comienza por una DNA glicosilasa y el hueco es rellenado por una DNA polimerasa de BER, como Pol β .

4.4 Replicación del DNA dañado

Los sistemas de reparación del DNA no son perfectos y dejan algunas lesiones en el DNA. Además, algunos daños causados durante la fase S del ciclo celular pueden no ser reparados a tiempo antes de ser alcanzados por la maquinaria de replicación (Fig. 1). Muchos tipos de lesiones como los sitios abásicos, fotoproductos causados por la radiación UV y aductos que distorsionan la doble hélice, detienen la síntesis por las DNA polimerasas replicativas. Para sobrepasar las barreras de replicación que implican estos daños, las células poseen DNA polimerasas especializadas capaces de sintetizar a través de las lesiones (TLS). La mayoría de las polimerasas TLS pertenecen a la familia Y, cuyos miembros se encuentran desde bacterias a humanos (Ohmori et al. 2001).

Las polimerasas de la familia Y presentan una procesividad de síntesis relativamente baja, una baja eficiencia catalítica, y una baja fidelidad cuando copian DNA no dañado. Su baja fidelidad de síntesis refleja la ausencia de actividad 3'-5' exonucleasa correctora de errores y la baja selectividad del sitio activo de la polimerasas por el nucleótido entrante. Las estructuras disponibles (Friedberg et al. 2001; Ling et al. 2001; Silvan et al. 2001; Trincao et al. 2001; Zhou et al. 2001) indican que la familia Y de polimerasas puede acomodar lesiones porque tienen un dominio dedos y pulgar anormalmente pequeños y porque su sitio activo posee residuos con cadenas laterales más pequeñas y no cargadas. Estas pueden ser más flexibles y sus sitios activos más abiertos y accesibles que polimerasas de otras familias.

Las células humanas contienen cinco polimerasas TLS: Pol ζ , Pol η , Pol ι , Pol κ y Rev1; de entre ellas solo Pol ζ pertenece a la familia B mientras que el resto son miembros de la familia Y. A pesar de las similitudes expuestas entre las polimerasas TLS, cada miembro está especializado en tolerar un tipo concreto de lesiones en el DNA. Aunque algunas DNA polimerasas pueden llevar a cabo los dos pasos de síntesis a través de la lesión (incorporación del nucleótido frente a la lesión y extensión del par formado), muchas lesiones, especialmente las que producen una gran distorsión de la doble hélice, requieren una polimerasa TLS para mediar la inserción frente a la lesión y otra diferente para llevar a cabo la subsiguiente extensión. Pol ζ resulta ser una DNA polimerasa con una síntesis bastante fiel y baja eficiencia copiando daños en el DNA molde pero está altamente adaptada para la reacción de extensión (Johnson et al. 2000). Pol η polimeriza a través de un dímero de timinas en el DNA molde incorporando dos As frente a las dos Ts del dímero (Fig. 10). Esto implica que la acción de Pol η promueve una replicación libre de error a través de un ciclobutano de pirimidinas (CPD) inducido por UV. La ausencia de Pol η causa una hipersensibilidad a UV conocida como variante de xeroderma pigmentoso (XPV) (Lehmann et al. 1975). Pol ι puede incorporar nucleótidos frente a sitios abásicos y frente a la T en 3' del dímero de timinas pero no puede llevar a cabo la subsecuente extensión (Johnson et al. 2000). Pol κ se diferencia de las otras polimerasas de la familia Y por poseer una fidelidad de síntesis mayor y a la vez una gran capacidad de extender pares de bases erróneos (Johnson, Prakash, et al. 2000; Washington et al. 2002). Rev1 interacciona con múltiples DNA polimerasas de TLS (Guo et al. 2003). La intervención de múltiples polimerasas en el paso del DNA

dañado implica la participación de proteínas accesorias. La mayoría de las DNA polimerasas de TLS interaccionan con el PCNA. Además, el tráfico entre las diferentes polimerasa de TLS podría estar modulado por modificaciones del PCNA. Trabajos recientes indican que las interacciones proteína-proteína del PCNA en la replicación y la reparación del DNA puede ser modulado diferencialmente por ubiquitinaciones o sumoilaciones del PCNA inducidas por la presencia de daño en el DNA (Hoege et al. 2002; Ulrich 2004).

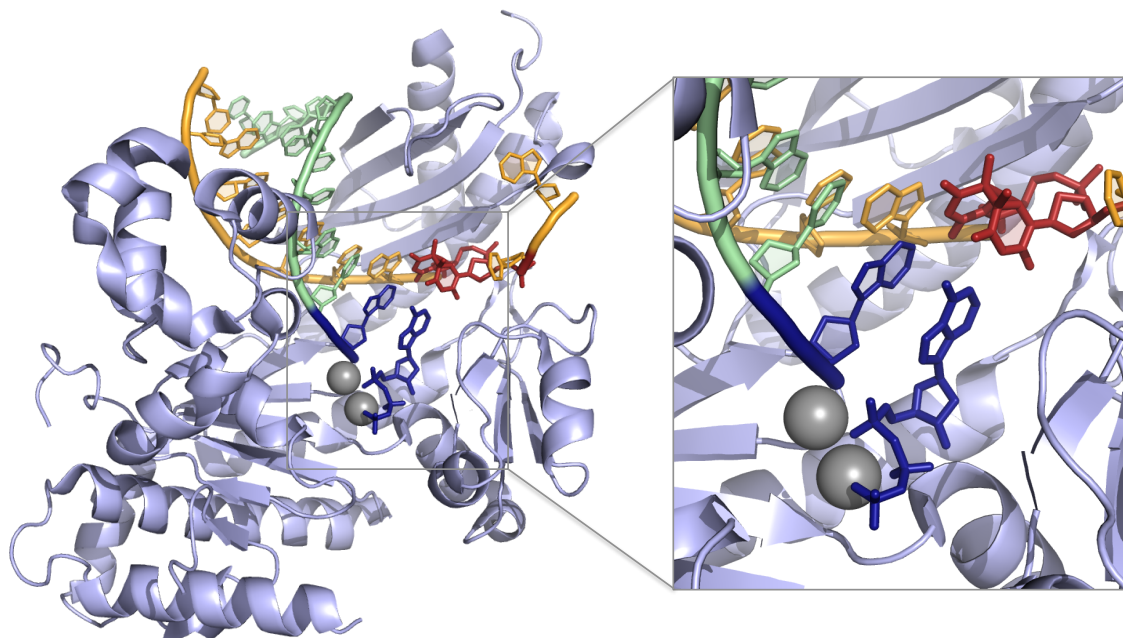


Figura 10. Complejo ternario con Polη. Polη, en complejo con una molécula molde/iniciador de DNA que contiene un CDP en el molde, coordinando los dos metales en el centro activo de la proteína y el nucleótido entrante. En el detalle puede verse como alinean las As (azul) del extremo del iniciador (verde) y del nucleótido entrante con las dos Ts del CDP (rojo) del molde (amarillo). (PDB 3SI8).

4.5 Desarrollo del sistema inmune

Se requiere una gran variedad de inmunoglobulinas para el mantenimiento del sistema inmune. Esta variedad resulta de la recombinación V(D)J del gen de la inmunoglobulina (Ig) (Fig. 11). Las células de mamíferos contienen una polimerasa independiente de molde perteneciente a la familia X, la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). De forma independiente al molde de DNA TdT inserta nucleótidos en las uniones entre los segmentos V, D y J en el momento de la recombinación para dar lugar a las cadenas pesadas de las Ig (Gellert 2002). Se sabe que Polμ (homóloga a TdT) está involucrada en estos reordenamientos en estados donde TdT aún no está expresada (Gozalbo-López et al. 2009).

La hipermutación somática es un proceso que se caracteriza por una aumentada frecuencia de mutaciones por sustitución en una zona de la región V de los genes Ig. Recientes evidencias (revisado en Goodman 2002) indican que las DNA polimerasas responsables de dicha síntesis podría incluir miembros de la familia B (Polζ, Polδ, Polε) y de la familia Y (Polη o Polι).

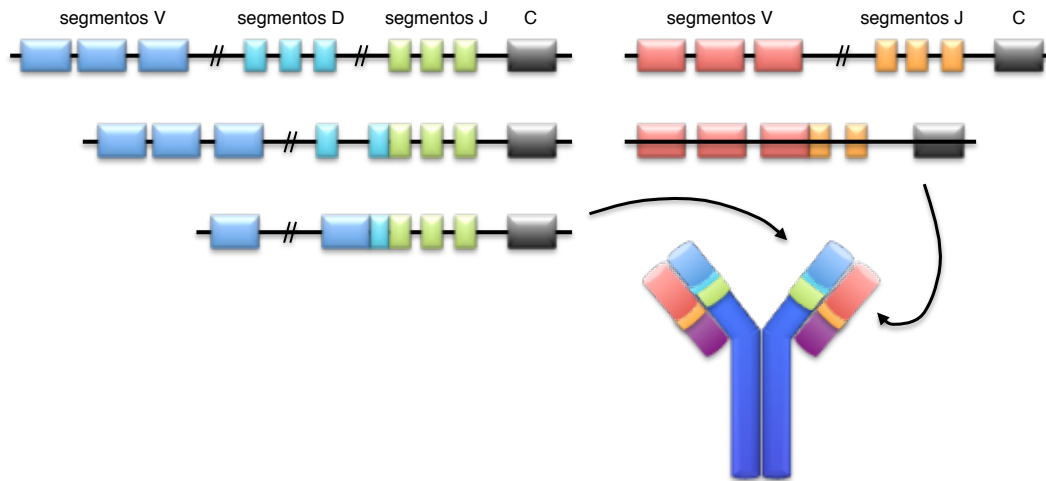


Figura 11. Recombinación V(D)J. El reordenamiento del DNA para crear la variabilidad genética de la región variable de las moléculas inmunoglobulinas. Este proceso implica la generación de roturas de doble cadena programadas y pone en juego a los factores de NHEJ para resolver las DSB.

OBJETIVOS

1. Clonaje, expresión y purificación de la proteína codificada por el gen humano CCDC111
2. Caracterización de la actividad primasa de la proteína ccdc111
3. Caracterización bioquímica de otras actividades de ccdc111 (PrimPol): actividad DNA primasa y DNA polimerasa de translesión
4. Análisis del centro activo de PrimPol y de los residuos implicados en la catálisis
5. Estudio funcional del dominio dedo de zinc presente en el extremo C-terminal de PrimPol
6. Estudio preliminar de la posible implicación de PrimPol en la replicación de los genomas nuclear y mitocondrial

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1 Enzimas

Las endonucleasas de restricción fueron obtenidas de *New England Biolabs* (Beverly, MA, USA) y *Roche* (Alemania). La polinucleótido quinasa de T4 (T4 PNK), uracil DNA glicosilasa (UDG) y DNA polimerasa Vent se adquirieron en *New England Biolabs* (USA). La endonucleasa humana de sitios apurínicos/apirimidínicos (hAPE) fue cedida por el Dr. S. H. Wilson (NIEHS, Research Triangle Park, NC). Las kinasas humanas Chk1 y Chk2 fueron adquiridas en *Abcam* (UK). Las hPol λ y hPol μ humanas purificadas se obtuvieron como se describió anteriormente (Domínguez y cols., 2000; García-Díaz y cols., 2002).

1.2 Reactivos

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos, fueron suministrados por *Merck* (Alemania), *Sigma-Aldrich* (USA).

Las resinas de cromatografía utilizadas para la purificación de proteínas fueron *Ni-NTA Superflow* de *Qiagen* (Alemania) y *Heparin Sepharose Fast Flow* de *GE Healthcare* (USA).

1.3 Nucleótidos

Se utilizaron ribonucleótidos (NTPs), desoxirribonucleótidos (dNTPs) y didesoxirribonucleótidos (ddNTPs) ultra puros, que fueron obtenidos en *GE Healthcare* (USA). [α - 32 P] desoxiadenosin 5'-trifosfato (3000Ci/mmol), [α - 32 P] desoxicitidin 5'-trifosfato (3000Ci/mmol), [α - 32 P] adenosin 5'-trifosfato (3000Ci/mmol), [α - 32 P] citidin 5'-trifosfato (3000Ci/mmol), [γ - 32 P] adenosin 5'-trifosfato (3000Ci/mmol) y [γ - 32 P] guanosin 5'-trifosfato (3000Ci/mmol) fueron obtenidos de *Perkin Elmer* (Waltham, MA, USA).

Análogos de nucleótidos como el araCTP y la Fludarabina trifosfato fueron adquiridas de *Jena Bioscience* (Alemania) y el 3'dATP (cordicepina trifosfato) de *Sigma-Aldrich* (USA).

1.4 DNA y RNA oligonucleótidos

El DNA de cadena simple M13 fue obtenido de *New England Biolabs* (USA). Los oligonucleótidos empleados en el clonaje y construcción de las diferentes variaciones sobre la proteína humana PrimPol (ver Tabla 2) fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich* (USA).

DNA y RNA oligonucleótidos fueron sintetizados por *Sigma-Aldrich* (USA). Los oligonucleótidos utilizados como sustratos de DNA en ensayos enzimáticos fueron purificados por gel de poliacrilamida 20% urea 8M (Tabla 3).

2. Métodos

2.1 Clonaje y mutagénesis dirigida

2.1.1 Clonaje del cDNA de la proteína codificada por el gen CCDC111 humano (hPrimPol)

El cDNA correspondiente al gen CCDC111 humano fue comprado a *ImaGenes*. El cDNA fue amplificado por PCR usando los oligos *WTforward* o *WTforwardHIS* y *WTreverse* (Tabla 2) que introducen las dianas *XbaI*, *NdeI* y *BamHI* respectivamente. El fragmento amplificado fue insertado en el vector de expresión pET16 usando los sitios de restricción *XbaI* y *BamHI* para la construcción de la proteína silvestre (WT) y *NdeI* y *BamHI* para la construcción con una cola de histidinas (His₁₀) en el amino terminal. Se utilizó la cepa DH5 α para la conservación de los nuevos plásmidos pET16::CCDC111 y pET16::HISCCDC111 y se comprobó por secuenciación que no existieran errores en la secuencia del inserto de los mismos. Posteriormente los plásmidos fueron utilizados para transformar varias cepas bacterianas de expresión de *Escherichia coli*.

2.1.2 Diseño y construcción de las proteínas con mutaciones puntuales

Las mutaciones puntuales se realizaron mediante mutagénesis dirigida sobre el vector de expresión pET16::HISCCDC111 utilizando el protocolo de Stratagene. Para ello se diseñaron oligonucleótidos iniciadores que contienen la mutación puntual (Tabla 2) siguiendo las indicaciones del protocolo y se llevó a cabo la amplificación del plásmido mediante PCR usando la DNA polimerasa Vent (NEB), que es de alta fidelidad sin capacidad de desplazamiento de banda. Posteriormente se llevó a cabo la eliminación del DNA original (metilado) mediante la digestión con DpnI. El producto final se transformó en la cepa *E. coli* DH5α. Las construcciones obtenidas se analizaron y confirmaron por restricción y secuenciación del inserto del vector.

2.1.3 Diseño y construcción de la proteína delecionada PrimPolΔZn

Se realizó un estudio comparativo de la secuencia humana de PrimPol y la de sus homólogos, que permitió definir la conservación del motivo dedo de Zinc desde el aminoácido 409 hasta el final de la proteína. De modo que, para su deleción, se diseñó un iniciador que introdujera un codón de parada en fase tras el nucleótido 1227 de PrimPol y la diana *Bam*HI. Se realizó la PCR con el oligo WT_{forward}HIS y ΔZn para obtener el fragmento de 1 a 409 aa más la cola de histidinas del extremo amino. El fragmento amplificado fue insertado en el vector de expresión pET16 usando los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI. Se utilizó la cepa *E. coli* DH5α para la conservación del nuevo plásmido y se comprobó que la secuencia del inserto fuera correcta.

2.2 Expresión y purificación de la proteína PrimPol y todas sus variantes

La expresión de la versión WT de PrimPol clonada en el vector pET16 (pET16::CCDC111), sin ningún *tag*, se intentó usando las cepas de *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)-pLysS o BL21(DE3)-pRIL obteniéndose un producto de degradación cuyo peso molecular estimado era de 30 kDa, lo que revelaba la inestabilidad de la proteína.

Finalmente para la expresión de la proteína intacta se utilizó la cepa BL21 (DE3) pRIL de Novagen (USA) que fue transformada con la construcción pET16::HISCCDC111 y crecidas a 37 °C o/n. El cultivo se diluyó y creció a 30°C hasta una OD₆₀₀ (densidad óptica a 600nm) de 0.8 y entonces se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo inducido se dejó crecer durante 2 h a 30°C. Las células fueron recogidas por centrifugación (10 min a 5000 rpm). El pellet celular fue resuspendido en tampón L (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 2 mM BME, 10 mM Imidazol) con 400 mM AcNH₄ y lisado por sonicación manteniendo la muestra en hielo. El lisado celular fue centrifugado a 15000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se puso en contacto (en modo *batch*) con la matriz de Ni-NTA Agarose (Qiagen), previamente equilibrada con el mismo tampón, durante 4 h a 4°C. Las uniones inespecíficas fueron eliminadas mediante un lavado de 10 volúmenes de columna con el mismo tampón y con 50 volúmenes del tampón L. Se realizó un lavado de 50 volúmenes con tampón L sin AcNH₄ y con 20mM Imidazol. Para bajar la fuerza iónica se realizó un lavado de 50 volúmenes de columna con el tampón M [50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 2 mM βME] con 20 mM Imidazol. La elución se llevó a cabo con el tampón M con 400 mM Imidazol, recogiendo diferentes fracciones correspondientes a la proteína unida a la columna, incluida PrimPol. Este eluido se incubó (en *batch*) con una matriz Heparina Sepharosa (GE Healthcare) previamente equilibrada con el mismo tampón. Posteriormente se montó una columna con la matriz de Heparina y las proteínas unidas a esta. La columna fue lavada con 20 volúmenes del tampón M con 50 mM NaCl, posteriormente con 100 mM NaCl y la proteína fue eluida con el tampón M a 1 M NaCl. La presencia de PrimPol fue analizada por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

Las fracciones que contenían PrimPol se unieron y se ajustaron a un tampón 25 mM Tris-HCl pH 8, 50% glicerol, 500 mM NaCl y 1 mM DTT. Después de determinar la concentración de proteína por espectrometría y cuantificación en gel se hicieron partes alícuotas y se guardaron a -20°C.

2.3 Sedimentación en gradiente de glicerol

Para eliminar una posible contaminación de otras proteínas con actividades similares a las supuestamente intrínsecas a PrimPol, se realizó un paso más de purificación basado en la separación por diferencia de sedimentación en condiciones nativas. Para ello se formó un gradiente desde el 15% al 30% de glicerol a partir de dos soluciones del tampón G (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT y glicerol al 30% o al 15%). El eluido de la Heparina Sepharosa se separó por centrifugación a 55.000 rpm, durante 20 h a 4°C. El gradiente se recogió en alícuotas de 200 μ l, desde la parte superior, que fueron posteriormente valoradas en actividad.

2.4 Ensayos de la actividad primasa

2.4.1 Ensayo de la actividad primasa sobre el sustrato M13 de cadena sencilla

El ensayo primasa fue llevado a cabo en un tampón de reacción con 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA y 1 mM MnCl_2 . La reacción, en un volumen de 20 μ l, contiene: 400nM de proteína y 60 μ M, en bases (8 μ M, en moléculas) de M13cs, 16 nM de un nucleótido marcado ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ribonucleótido, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ desoxirribonucleótido o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ribonucleótido, según se indique) y diferentes concentraciones de NTPs o dNTPs fríos. Después de incubar a 30°C durante 60 min. Las reacciones se pararon añadiendo 8 μ l de tampón de parada (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%) y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% en presencia de 8 M urea. Los productos se visualizaron por autorradiografía.

Para ensayar la actividad primasa en extractos inducidos de células transformadas con el vector de expresión, se realizaron inducciones en las mismas condiciones que para la purificación. Como control se utilizó la inducción de células BL21 (DE3) pRIL con el pET16 vacío. Los *pellets* celulares fueron resuspendidos en 100 μ l del tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT y 0.1 mg/ml BSA y fueron lisados por sonicación. El ensayo primasa se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero añadiendo 2 μ l del extracto. La reacción se analizó tanto en condiciones nativas, observando la incorporación de nucleótidos *de novo* sobre un sustrato M13 de cadena sencilla (DNACs) en un gel de agarosa al 0.8% como en condiciones desnaturalizantes, analizando los tamaños de oligonucleótidos sintetizados *de novo* en un gel al 20% de poliacrilamida con urea (8 M).

2.4.2 Ensayo de la actividad primasa sobre DNA lineal

El ensayo primasa fue llevado a cabo en un tampón de reacción con 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA y 1 mM MnCl_2 . La reacción, en un volumen de 20 μ l, contiene: 400nM de proteína y 1 μ M de oligo de cadena sencilla, 16 nM de un nucleótido marcado ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ribonucleótido, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ desoxirribonucleótido o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ribonucleótido, según se indique) y diferentes concentraciones de NTPs o dNTPs fríos. Después de incubar a 30°C durante 60 min. Las reacciones se pararon añadiendo 8 μ l de tampón de parada (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%) y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% en presencia de 8 M urea. Los productos se visualizaron por autorradiografía.

2.5 Medida de la actividad ATPasa

La actividad ATPasa fue medida como la cantidad de fosfato inorgánico libre después de la hidrólisis del ATP o dATP. Las reacciones (20 μ l) se llevaron a cabo en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM MnCl_2 y 400 nM de proteína. Se empleó DNA efector para la reacción, M13CS o el oligo Gtcc (1 μ M) y la concentración de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ o $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (3000 Ci/mmol) fue 1 mM con una relación frío-caliente 1:100 000. La reacción se paró añadiendo SDS (2,5% final) y el PPI libre se separó por cromatografía de capa fina utilizando cromatofolios PEI-celulosa F (Merck) y se detectó por autorradiografía.

2.6 Marcaje radiactivo de DNA e hibridación para la obtención de estructuras del tipo molde/iniciador

El marcaje radiactivo del DNAs se realizó mediante la incubación con 10 u de T4 polinucleótido kinasa (PNK) y 10 μ Ci de [γ - 32 P]-ATP (3000 Ci/mmol) durante 1 h a 37°C. La enzima se inactivó a 65°C durante 10 min. El oligonucleótido se separó del nucleótido radiactivo que pudo quedar libre mediante una columna de Sephadex G-50 o G-25, según el tamaño del oligo de *Sigma-Aldrich*.

La hibridación entre el molde y el iniciador se llevó a cabo en 80 μ l en tampón 20 mM Tris-HCl y 0.3 M NaCl, a una estequiometría 3:1 (molde/iniciador). Cuando se forma una estructura tipo GAP 3:1:3 (molde/iniciador/*downstream*). Cuando se utilizó M13cs y un iniciador complementario se utilizó la proporción 1:2 (molde/iniciador). En todos los casos la mezcla se lleva a 80°C durante 10 minutos y luego se deja bajar la temperatura lentamente hasta que alcanza la ambiental para favorecer la hibridación.

2.7 Ensayos polimerasa

Se marcó radiactivamente el extremo 5' del iniciador Sp1C (Tabla 3) y se hibridó con el molde T13 (A, C, G o T) como se indica anteriormente. El ensayo (20 μ l) contiene 2.5 nM del sustrato, 200 nM de proteína en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM $MnCl_2$ y diferentes concentraciones de NTPs o dNTPs. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60 min, se pararon añadiendo 8 μ l de tampón de parada (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%) y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% en presencia de 8 M urea. Los productos se visualizaron por autorradiografía.

Para formar un estructura tipo GAP con un hueco de 5 nucleótidos se hibridó el iniciador Sp1C con el molde T18 y la molécula *downstream* Dg5-P o Dg5-OH con la proporción indicada. El ensayo (20 μ l) contiene 2.5 nM del sustrato, desde 200 nM de proteína en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM $MnCl_2$, y varias concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 μ M) de dNTPs. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60 min, fueron paradas y analizadas según se ha explicado anteriormente.

2.7.1 Polimerización a través de bases modificadas

Se marcó radiactivamente el extremo 5' del iniciador Sp1C Δ 3 (Tabla 3) como se indica anteriormente y se hibridó con el molde T13-8oxoG o el molde T13G como control. El ensayo (20 μ l) contiene 2.5 nM del sustrato molde/iniciador, 200 nM de proteína en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM $MnCl_2$ y diferentes concentraciones de dNTPs. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60 min, fueron paradas y analizadas según se explica.

Para evaluar la selección del nucleótido insertado frente a la base 8oxoG se marcó radiactivamente el extremo 5' del iniciador pber (Tabla 3) como se indica anteriormente y se hibridó con el molde T4-8oxoG o el molde T4G como control. El ensayo (20 μ l) contiene 2.5 nM del sustrato, 200 nM de proteína en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM $MnCl_2$ y diferentes concentraciones de cada uno de los dNTPs. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60 min y fueron analizadas del mismo modo que las anteriores.

Para el estudio de la polimerización a través de 5FU en el molde, se marcó radiactivamente el extremo 5' del iniciador pFU como se indica anteriormente y se hibridó con el molde p6-5FU y el molde p6-T o p6-U como control.

Con el fin de evaluar la copia del 6meG se marcó radiactivamente el extremo 5' del iniciador pber como se indica anteriormente y se hibridó con el molde T4-6G o el molde T4G como control.

En el caso de la tolerancia a 5meC, 5HmeU y 5HU el iniciador p5 marcado radiactivamente en el extremo 5' como se indica y se hibridó con el molde T-5meC, T-5HmeU, T-5HU y el T-C o el T-U como controles.

2.7.2 Polimerización a través de sitios abásicos

Se marcó radiativamente el extremo 5' del iniciador pXΔ3 (Tabla 3) como se indica anteriormente y se hibridó con el molde T-XT, T-XXT o el molde T-TT como control. El ensayo (20 μ l) contiene 2.5 nM del sustrato de DNA, 200 nM de proteína en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM MnCl₂ y diferentes concentraciones de dNTPs. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60 min, se pararon añadiendo 8 μ l de tampón de parada (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%) y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% en presencia de 8 M urea. Los productos se visualizaron por autorradiografía.

Para evaluar la inserción y copia del siguiente nucleótido se marcó radiativamente el extremo 5' del iniciador pX como se indica anteriormente y se hibridó con el molde T-XA, T-XC, T-XG o T-XT y el molde T-TT como control. El ensayo se realizó como se describe anteriormente añadiendo cada desoxirribonucleótido por separado a las concentraciones indicadas. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60 min, fueron analizadas del mismo modo.

2.7.3 Polimerización a través de un dímero de timinas

El análisis de la translesión del dímero de timinas se realizó marcando radiativamente el iniciador pCPDΔ3 como se ha explicado previamente y se hibrida con el T=T y el TT. El ensayo (20 μ l) contiene 2.5 nM del sustrato, 200 nM de proteína en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM MnCl₂ y diferentes concentraciones de dNTPs. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60 min, fueron analizadas según se explica anteriormente.

Para evaluar la inserción frente al dímero se marcó radiativamente el extremo 5' del iniciador pCPD como se indica y se hibridó con el molde T=T o el molde TT como control. El ensayo se realizó como se describe anteriormente añadiendo cada desoxirribonucleótido por separado a las concentraciones indicadas. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60 min, fueron analizadas del mismo modo.

Posteriormente se diseñaron iniciadores que contienen uno o dos nucleótidos que cubren el dímero de timinas y se evaluó la extensión de los mismos.

2.8 Ensayo de unión a DNA

Se usaron diferentes sustratos de DNA, estructuras molde-cebador marcado en 5' a 1 nM y otros oligonucleótidos de cadena sencilla marcados en 5' a una concentración final de 0.4 nM. Las reacciones de unión (en 20 μ l) se llevaron a cabo en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA, con las concentraciones indicadas de proteína, se incubó a 30°C durante 10 min. Se añadió tampón de carga (50% glicerol, 1 mM EDTA, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%) y las uniones se analizaron en un gel nativo de poliacrilamida al 4% que corrió a 180 V a 4°C. El resultado se observó mediante autorradiografía.

2.9 Ensayo de actividad desoxirribosafosfato liasa (dRP-liasa)

El oligonucleótido P6-1 (180 pmol), con un uracilo en posición 16 se hibridó con un oligonucleótido complementario T4 (en relación 1:1), en presencia de 50 mM Tris HCl pH 7.5 y 300 mM NaCl. El híbrido P6-1/T4 se marcó en el extremo 3' empleando Klenow (2 u) y [α -³²P] dCTP (80 μ Ci). Este sustrato (500 nM) se incubó con hUDG (100 nM) a 37°C durante 20 min en 20 μ l de tampón compuesto por 50 mM Hepes (pH 7.5), 20 mM KCl y 2 mM DTT, para eliminar el uracilo. Tras la incubación, se añadió MgCl₂ a una concentración final de 10 mM y 50 nM hAPE, para generar el sustrato de la actividad dRP liasa.

Las reacciones (25 μ l) contuvieron 50 mM Hepes (pH 7.5), 20 mM KCl, 2 mM DTT y 100 nM del sustrato descrito anteriormente. Las reacciones se iniciaron con la adición de las cantidades indicadas de cada DNA polimerasa y se incubaron a 30°C durante 20 minutos. Tras la incubación, se añadió NaBH₄ a una concentración final de 340 mM y las reacciones se mantuvieron en hielo durante

20 min. Los productos estabilizados (reducidos) se precipitaron en presencia de etanol 100%, 0.5 M de AcNH_4 y 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de tRNA. Se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar. Por último se resuspendieron las muestras en tampón de parada (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%) y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% en presencia de 8 M urea. Los productos se visualizaron por autorradiografía.

2.10 Producción de anticuerpos contra hPrimPol

Se utilizaron dos conejos hembras puestos en cuarentena en el animalario de Biociencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Se realizaron varios inóculos de 500 μg de proteína purificada con 500 μl de coadyuvante de Freud (Sigma). En la primera inoculación se usó coadyuvante completo y en las 5 restantes, realizadas con intervalos de 10 días, con coadyuvante incompleto.

Se obtuvo el suero inmune de la sangre de los conejos por sangría a muerte. Las IgGs fueron purificadas por afinidad de las mismas a una columna de proteína A (BioRad, USA) y eluidas por cambio de pH.

Se obtuvieron anticuerpos comerciales (OPEN Biosystems, part of Thermo Fisher, USA) producidos contra un péptido de la región C-terminal de la proteína humana PrimPol, con la secuencia: N- CEVDEIPDELIIEVLQE -C. La empresa proporcionó suero total e IgGs purificadas.

2.11 Inmunodetección de proteínas en membrana (Western blot)

Las IgGs fueron probadas contra extractos celulares de *E. coli* control (con el plásmido vacío) o correspondientes a la cepa que expresa la proteína. También se establecieron las concentraciones necesarias del anticuerpo para detectar la mínima cantidad posible de proteína purificada.

Los extractos celulares se corren en un gel SDS/PAGE y se realiza una transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Para la transferencia se utilizó el sistema de transferencia húmeda de *Bio-Rad* en tampón Tris HCl 25 mM, glicina 19 mM y metanol 20%, aplicando durante 60 min una corriente de 100 mV. La membrana posteriormente se bloquea en tampón de bloqueo (leche desnatada 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 1%) durante 1 h a temperatura ambiente y se realizan 3 lavados de 5 min con PBS-Tween. A continuación se incuba con el anticuerpo primario a una concentración de 1,83 ng/ μl durante 1 h y se realizan 4 lavados de 5 min con PBS-Tween. Por último se incuba durante 1 h con el anticuerpo anti-rabbit conjugado con peroxidasa (Sigma), se realizan 3 lavados de 10 min y se revela por quimioluminiscencia (Amersham Biosciences).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para llevar a cabo mutagénesis dirigida

Nombre	Secuencia 5' - 3'
<i>WTforward</i>	CCACACTTCTTCTAGATGAATAGAAAATGGGAAGCAAAA
<i>WTforwardHIS</i>	CACTTCTGAACATATGAATAGAAAATGGGAAGCAAAA
<i>WTreverse</i>	G TTCATAGTGGGATCCTTACTCTTGTAATACTTCTATAATTAGTTC
<i>AxAforward</i>	GTGCAAGCTTTATTTTGCTTTGGCATTTAACAAACCTGCCAACCC
<i>AxAreverse</i>	GGGTTGGCAGGTTTGTTAAATGCCAAAGCAAAATAAAGCTTGCAC
<i>D114Aforward</i>	GTGCAAGCTTTATTTTGCTTTGGAATTTAACAAACCTGCCAACCC
<i>D114Areverse</i>	GGGTTGGCAGGTTTGTTAAATTCCAAAGCAAAATAAAGCTTGCAC
<i>D114Eforward</i>	GTGCAAGCTTTATTTTGAAATGGAATTTAACAAACCTGCCAACCC
<i>D114Ereverse</i>	GGGTTGGCAGGTTTGTTAAATTCCAATTCAAAATAAAGCTTGCAC
<i>E116Aforward</i>	GTGCAAGCTTTATTTTGATTTGGCATTTAACAAACCTGCCAACCC
<i>E116Areverse</i>	GGGTTGGCAGGTTTGTTAAATGCCAAATCAAAATAAAGCTTGCAC
<i>E116Dforward</i>	GTGCAAGCTTTATTTTGATTTGGACTTTAACAAACCTGCCAACCC
<i>E116Dreverse</i>	GGGTTGGCAGGTTTGTTAAAGTCCAAATCAAAATAAAGCTTGCAC
<i>D280Aforward</i>	GAAGCATCTTTTGTAGCTCTCGGAGTTTATACAAG
<i>D280Areverse</i>	CTTGTATAAACTCCGAGAGCTACAAAAAGATGCTTC
<i>D280Eforward</i>	GAAGCATCTTTTGTAGAGCTCGGAGTTTATACAAG
<i>D280Ereverse</i>	CTTGTATAAACTCCGAGCTCTACAAAAAGATGCTTC
<i>H169Aforward</i>	GAAAAATTCAGCCGGGCTTTAATATTTTCAGCTCCATGATGTGG
<i>H169reverse</i>	CCACATCATGGAGCTGAAATATTAAAGCCCGGCTGAATTTTTC
<i>H169Yforward</i>	GAAAAATTCAGCCGGTATTTAATATTTTCAGCTCCATGATGTGG
<i>H169Yreverse</i>	CCACATCATGGAGCTGAAATATTAAATACCGGCTGAATTTTTC
<i>ΔZnreverse</i>	CATAGTGGGATCCTTAAACCAGTAATTCTTCTGGG
<i>CHforward</i>	GATATTTGTAAATATCGGTGGGGTGAAAACATTGGAAGAGCCTATAAGAGTAATAATATAATG
<i>CHreverse</i>	CATTATATTATTACTCTTAATAGCTCTTCCAATGTTTTACCCACCGATATTTACAAATATC
<i>CCforward</i>	GTTTGGTATCAAAAAGGTCATGACCCTGTAGGTAAAGCAGAAAACCTCAAATCTGAC
<i>CCreverse</i>	GTCAGATTTGAAGTTTTCTGCTTTACCTACAGGGTCATGACCTTTTTGATACCAAAC

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados como sustratos de DNA en ensayos bioquímicos.

Nombre	Secuencia 5' - 3'
Gtcc-L	TTTCCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Gcccca	TTTTTTTTTTTTTTTTTACCCCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Gtcc	TTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTTT
Atcc	TTTTTTTTTTTTTTTTTCCTATTTTTTTTTTT
Ctcc	TTTTTTTTTTTTTTTTTCCTCTTTTTTTTTTTT
Ttcc	TTTTTTTTTTTTTTTTTCCTTTTTTTTTTTTTT
Gtgc	TTTTTTTTTTTTTTTTTCGTGTTTTTTTTTTT
Atcc-L	TTTCCTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
A-GTC-A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
A-TGTC-A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
A-GTGTC-A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
TGTC	AAAAAAAACGTAAAAA
TCTC	AAAAAAAACCTAAAAA
TATC	AAAAAAAACATAAAAA
TTTC	AAAAAAAACTTAAAAA
GTCC-1	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
GTCC-2	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
GTCC-3	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
GTCC-4	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
GTCC-5	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
GTCC-6	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
GTCC-7	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
GTCC-8	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
GTCC-9	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
GTCC-10	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGTTTTTTTTTT
AGG-Adown	AGGAAAAAAAAAAAAAAAAA
Adown	AAAAAAAAAAAAAAAAAA
GTCC- comp	AAAAAAAAAAACAGAAAAAAAAAAAAAAAAA
-40primer	GTTTCCCAGTCACGAC
T13T	AGAAGTGATCTTGTACTCACTGTGATC
T13A	AGAAGTGATCTAGTACTCACTGTGATC
T13C	AGAAGTGATCTCGTACTCACTGTGATC
T13G	AGAAGTGATCTGGTACTCACTGTGATC
Sp1C	GATCACAGTGAGTAC
Sp1CRNA	GAUCACAGUGAGUAC
T13RNA	AGAAGUGUAUCUUGUACUCACUGUGAUC

T6	TCTATCGTACTCACTGTGATC
Sp1CC	GATCACAGTGAGTACC
Sp1CG	GATCACAGTGAGTACG
T18	ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC
DG5-P	AACGACGGCCAGT-P
DG5-OH	AACGACGGCCAGT
DG1-P	AGATACACTTCT
FP-T	GGCAGCTTGGATCTTGTCGAAAAACGTCAACATTGCGCTAGGCTTCGGCAATACTGAGGTCT TGTCGAAAAACGTCAACATTGCGTGGCC
FP-P	GGCCACGCAATGTTGACGTTTTTCGACAAGACCTCAGTAT
FP-SD	GGCCACGCAATGTTGACGTTT
P6-1	CTGCAGCTGATGCGCUGTACGGATCCCCGGGTAC
T4	GTACCCGGGGATCCGTACGGGCGCATCAGCTGCAG
T4-8oxoG	GTACCCGGGGATCCGTAC8GGGCGCATCAGCTGCAG
pber	CTGCAGCTGATGCGCC
T13-8oxoG	AGAAGTGTATCT8GTACTCACTGTGATC
Sp1CΔ3	GATCACAGTGAG
8tcc	TTTTTTTTTTTTTTTTTCT8TTTTTTTTTTT
T-TT	CTCGTCAGCATCTTCATTCATACATCAGTG
T-XT	CTCGTCAGCATCTXCATTCATACATCAGTG
T-XXT	CTCGTCAGCATCTXCATTCATACATCAGTG
pXΔ3	CACTGACTGTATG
pX	CACTGACTGTATGATG
T-XA	CTCGTCAGCATCAXCATTCATACATCAGTG
T-XC	CTCGTCAGCATCCXCATTCATACATCAGTG
T-XG	CTCGTCAGCATCGXCATTCATACATCAGTG
TT	AGGATAGTGACAGTAGTGTATGTTATAGTCAGTCAGTATGATCGTACGG
T=T	AGGATAGTGACAGTAGTGTATGT=TATAGTCAGTCAGTATGATCGTACGG
pCDPΔ3	CCGTACGATCATACTGAC
pCPD	CCGTACGATCATACTGACTAT
pCPD-A	CCGTACGATCATACTGACTATA
pCPD-G	CCGTACGATCATACTGACTATG
pCPD-AA	CCGTACGATCATACTGACTATAA
pCPD-GA	CCGTACGATCATACTGACTATGA
P6-5FU	GTACCCGGGGATCCGTACFGCGCATCAGCTGCAG
P6-T	GTACCCGGGGATCCGTACTGCGCATCAGCTGCAG
P6-U	GTACCCGGGGATCCGTACUGCGCATCAGCTGCAG
pFU	GTACCCGGGGATCCGTAC

T4-6mG	GTACCCGGGGATCCGTAC6GGCGCATCAGCTGCAG
T-5mC	CCATAAGGACCAGTCGCACTGG5CTCGACTTTCTTGTGTAAGTAGGGCACT
T-5HmeU	CCATAAGGACCAGTCGCACTGG5HmUCTCGACTTTCTTGTGTAAGTAGGGCACT
T-5HU	CCATAAGGACCAGTCGCACTGG5HUUCTCGACTTTCTTGTGTAAGTAGGGCACT
T-C	CCATAAGGACCAGTCGCACTGGCCTCGACTTTCTTGTGTAAGTAGGGCACT
T-U	CCATAAGGACCAGTCGCACTGGUCTCGACTTTCTTGTGTAAGTAGGGCACT
p5	GGTATTCCTGGTCAGCGTGACC

RESULTADOS

1

***Una nueva primasa de la
superfamilia AEP en eucariotas***

1.1 Identificación del gen humano CCDC111 como una Primasa Arqueo-Eucariota

El gen humano CCDC111 (nombre alternativo: FLJ33167) que codifica la proteína *coiled-coil domain containing 111* (ccdc111) mapea en el cromosoma 4 en la banda 4q35.1. El gen CCDC111 abarca una extensión de unas 40 kb y está formado por 14 exones que una vez ensamblados, originan un transcrito de 2295 bases que se traduce en un polipéptido de 560 aminoácidos con un peso molecular de 64.3 kDa. Según predicciones basadas en análisis *in silico* realizadas por el grupo de Aravind en 2005 (Iyer et al. 2005), ccdc111 parecía ser una buena candidata como posible nueva primasa de la familia *Archaeo-Eukaryotic Primases* (AEP). Las AEPs contienen en su dominio de reconocimiento del RNA (RRM) el motivo DxD (que en algunos casos es sustituido por DxE (Lipps et al. 2003)) y un tercer aspártico más alejado. Estos tres aspárticos están involucrados en la unión al metal activador de la reacción y, al igual que las DNA polimerasas, las AEPs siguen el mecanismo bi-metal clásico de incorporación de nucleótidos (Steitz & Steitz 1993). Mediante alineamientos múltiples con una gran cantidad de AEPs, tanto conocidas como presuntas, el grupo de Aravind identificó un posible motivo DxE (Asp¹¹⁴, Glu¹¹⁶), que podría formar parte de un sitio activo tipo AEP en la proteína ccdc111 (Fig. 12A). Asimismo, identificaron dos posibles residuos de ácido aspártico (Asp¹⁸¹ y Asp²⁸⁰) como candidatos para que uno de ellos aportase el tercer carboxilato, que junto con los dos residuos acídicos del motivo DxE, coordinaría el metal activador (Fig. 12B). Posteriores alineamientos de ccdc111 procedentes de diferente especies eucarióticas, realizados en nuestro laboratorio, indicaron que el Asp²⁸⁰ era el residuo más probable como candidato para la unión a metal, ya que está conservado en todos los ortólogos de ccdc111. Del mismo modo, el primer análisis *in silico* (Lipps et al. 2003) permitió identificar un residuo de histidina (His¹⁶⁹), que podría corresponder a la histidina invariante en AEPs, y que sería responsable de la unión al nucleótido entrante en ccdc111 (Fig. 12B).

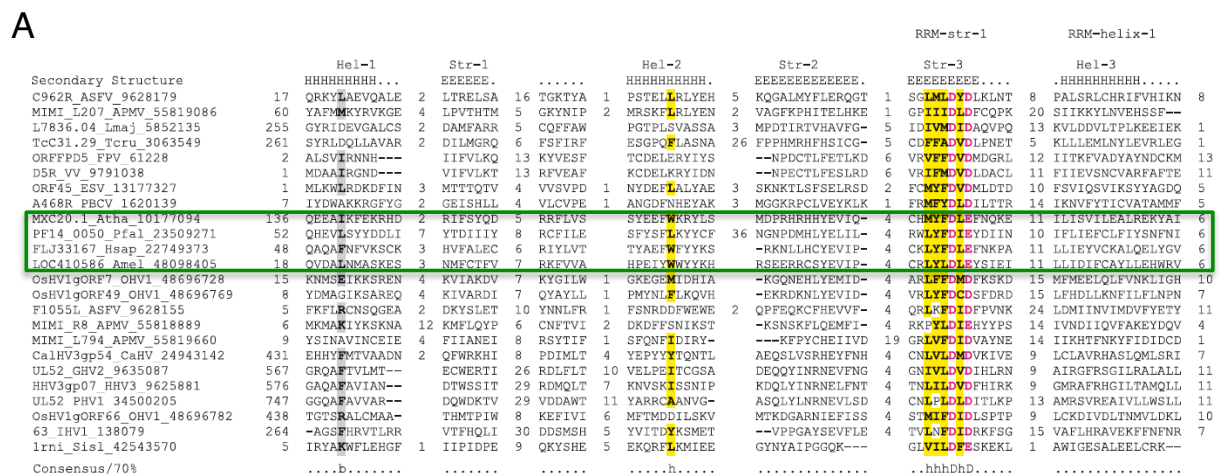


Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de la superfamilia AEP, tomado de Iyer et. al, 2005. A. Identificación del motivo DxX (magenta), centro activo del potencialmente nuevo miembro de la superfamilia AEP, que aquí se indica como FLJ33167_Hsap-22749373 (recuadrada en verde junto con otros ortólogos, de *Arabidopsis thaliana*, *Plasmodium falciparum* y *Apis mellifera*). **B.** Identificación de la histidina implicada en la unión del nucleótido y dos posibles aspárticos que forman parte del centro activo (magenta).

B

	RRM-str-2	RRM-str-3	RRM-helix-2	RRM-str-4	Flange	Hairpin-1	Hairpin-2	
Secondary Structure	Str-4	Str-5	Helix-4	Str-6/Hel				
PRIM_Afu1_7483287	EEEEEE	EEEEEEEE.....	HHHHH	EEEEEE	EEEEEE	EEEEEE	EEEEEE	
PH0195_Phor_7518519	MYKYYSGG	-RGVYVHLL--DEEFL	3 SAERRE	73 SIYDAVP	4 KRILIRP	GLSHKGKTG	1 RVTVEED	298VAEP small
AP00438_Apef_7515771	IIHIIYSG	-RGVYVHLL--DEWAL	3 SKSRER	106 KSYDGRV	4 KRILIRP	SLTHSKGVT	1 IAKRYVGT	310 subunit
PRIM1_Hsap_4506051	STIYYTGN	-RGFVLVLD--CGWCR	3 REERRE	65 RVAIDVKV	4 SRLARIV	GLSKAGVAG	1 LVARLGL	2771
pri-1_Cele_464461	RLWVYSGR	-RGVYVHLL--DESVR	3 SAVRSR	117 FPRIDINV	4 NHLLKSP	FVHPKGTG	1 ISVPIDL	3361
PRIL_Scer_6322198	RMWVYSGR	-RGVYVHLL--DKKAR	3 NYQRSA	129 YPRIDINV	4 NHLLKSP	FCIHPKGTG	1 VAVPLNV	3451
LEF-1_AchPV_1170750	SRVMTYGN	-RGFVLVLD--TDKFK	2 SAQNRV	50 WPDVDDI	4 NKQIRAP	ILHLPKGTG	1 VYVDFP	2231
LEF-1_OsnPV_2493162	QRIMVSGN	-RGFVLVLD--CGKFK	2 APKSLR	46 WPDVDDV	4 NKQIRAP	FSYNYKGTG	1 YSRCLTK	2201
lef-1_Cfcm_1754839	QRVMVSGN	-RGFVLVLD--CGRFR	2 SPKNVR	51 WPDVDDV	4 NKQIRAP	FSYNYKGTG	1 FSRCLTK	2231
R0938_Mtb_6226918	TFPVIYSGS	-RGLVLTPI--DEPVS	12 QRLEQA	16 KVFVDVSD	3 SKTTIAP	LYSLRGTH	2 VAAPRTW	257NHEJ Primases
SC46.19_Scoe_7479517	GWKPTYSGS	-RGLVLTPI--EPRWT	12 REMERR	16 RIFIDYNG	3 DRITASA	YSVRPRP	2 VSAPLTW	2561
SC156.07_Scoe_7479388	SAHVIYGS	-RGLVVVPI--DGRQD	12 DVLAQA	16 RIFYDIQR	3 AGTAVAP	LTVVRARP	2 VATPISW	2701
BC1863_Boer_30020005	MYATYSGS	-RGRHLLIS--SDALG	17 IFRND	17 LTVLIDV	3 KRMIRAP	NSHQKTN	1 FKTEISV	1831
RB12213_Rbal_32477383	LLIYTSGS	-RGRHLLIS--TKAIF	7 LFPKQ	16 SEYIDDSI	3 HRMRAP	1 YKTLPTL	1 YKTLPTL	1931
LCVdlp069_Ldvl_13358409	RVGLKRP	-RGRHLLIS--TSLFD	17 VEPSIE	16 RYVDVSD	3 VQPLRAP	NSHRKGTG	1 HKRILTF	1911
184R_CSL_2738452	RCVLEKPD	9 KQSFHLLP--KILM-	15 GDYIDLNS	2 VCVFTIG	7 PYCIKYVF	31 ACPLYTI	229Irido D5-like	NCLDV-herpes
C962R_ASFV_9628179	HKVIYSGE	8 KVSIVLAR--SMGA-	10 KVSIVLAR	4 ADEVNT	1 GRVVDVQ	11 FSSKIAP	5201	clade
MIMI_L207_APMV_55819086	VITVYFKE	9 HDGILVLP--YICT-	17 LDTLI	17 VKAIDTSV	1 RHKFSIR	19 LFTYVDY	2181	Herpes-pox
L7836.04_Iam_5852135	GEEIYFQV	8 KASPHVHR--LKAQA	13 LFNQDQI	4 GMLRQV	14 ESKNIGF	8 QALALSI	4641	primase
TC031.29_Toru_3063459	GFHPIYSG	10 KVSIVLAR--SMGA-	10 KVSIVLAR	4 ADEVNT	1 GRVVDVQ	11 FSSKIAP	5201	
ORFFP05_FPF_61228	MSRSLFDT	6 KSTFHIPLD--TYTT-	17 LDTLI	17 VKAIDTSV	1 RHKFSIR	19 LFTYVDY	2181	
DSR_VV_9791038	RCVYVSDT	14 KNGVYVLP--NLRIN	13 SDVDRAP	3 GLKMGCS	1 FRKVKCT	188 ARRLSVI	3921	
A468R_PBCV_1620139	TVMCILSN	9 KGVHVLTP--NIFVT	20 DSIIDVVS	4 GMLRQV	14 DYILDSN	10 EEIVKSV	2301	
MXC20.1_Aa_10177094	ILVDSOST	2 KFSRNVVPI--IP--	KV----	-AFKDNH	4 VGLCSIR	11 KGLFVKE	5 SLIFVDP	313
PF14_0050_Pfal_23509271	VLIDYST	2 KFSRNVVPI--NIIH-	58 LLEDDNS	4 VOLENHR	247 LTVLENT	19 LKCLIDS	5861	
FLJ33167_Hsap_22749373	VLIDYST	2 KFSRNVVPI--LH---	DV----	-AFKDNH	4 LKILQIP	68 SLFVKNK	3 KHLFVDL	2811
LOC10586_Amei_48098405	LFKSRVYSG	2 KFSRNVVPI--NI---	NI----	-AFKDNH	4 VLSFGHY	10 AFQKGGK	3 GRAVFDI	2011
OshVlgORF7_OHV1_48696728	LVFVYKRR	4 KHSFVLLP--KI---	11 VFNKNIQ	4 VLSFGHY	10 AFQKGGK	3 GRAVFDI	2011	fused
OshVlgORF49_OHV1_48696769	HIHRIYRI	4 KHSFVLLP--GI---	11 VFNKNIQ	4 VLSFGHY	10 AFQKGGK	3 GRAVFDI	2011	
F1055L_ASFV_9628155	QIILLDSI	8 KYSFHIILY--TYSVL	3 EAKAFT	11 YPFVDQV	19 LAEVFET	19 LFTYVDM	2141	
MIMI_R8_APMV_55818889	DVILLNSN	7 KLSVYVLP--PKNK-	11 YPFVDQV	19 LAEVFET	19 LFTYVDM	2141		
MIMI_L794_APMV_55819660	LDVYVHSC	4 KLSMHLVLP--NI---	11 YPFVDQV	19 LAEVFET	19 LFTYVDM	2141		
CalHV3gp54_CahV_24943142	PVVYFKSA	20 KGLGVVTP--LPRG-	20 KVSIVLAR	4 ADEVNT	1 GRVVDVQ	11 FSSKIAP	5201	Herpes-pox
UL52_GHV2_9635087	PCVYFKTS	7 KIGLVVCIPT--VPSP-	20 KVSIVLAR	4 ADEVNT	1 GRVVDVQ	11 FSSKIAP	5201	6761 viruses
HHV3gp07_HHV3_9625881	PCVYFKTS	7 KIGLVVCIPT--VPSP-	20 KVSIVLAR	4 ADEVNT	1 GRVVDVQ	11 FSSKIAP	5201	
UL52_PHV1_3450205	VPYFKYKTQ	96 KIGLVVCIPT--IPKP-	20 KVSIVLAR	4 ADEVNT	1 GRVVDVQ	11 FSSKIAP	5201	
OshVlgORF66_OHV1_48696782	HYLVHFSR	8 KQYHVRHLP--LFDN-	28 YVDVSCI	24 YHGRSLP	4 NKQIRAP	GVQVRSQ	4 ICYVRSQ	6721
63_HV1_138079	AVYVHFSR	5 KFSAFVFPF--AYELC	FNQIRE	31 VCADIAQP	3 NKSRLAP	20 NALVKSNR	16 DRSLSGD	5341
lrl1_Sial_42543570	TLCTNTVTH	-RGRHLLIS--NDIP-	PHKNIP	6 KGLIDQLS	1 YSNYVVG	1 GSCVNHVN	13 TCYTLTY	171Primpol family
SC03972_Scoe_21222376	GPVYVHSG	-RGRHLLIS--YSMQE	LGELLY	5 PGSLRPHG	1 GYSLVAG	1 PSEHTGHT	18 VEAUVDA	2061
Chte02003448_Cthe_48857378	TVATVYGS	-GGRHLLIS--PKGR-	SIPNKT	2 APGLDMRS	1 GLGIIAV	PSHISIRN	11 DRILAP	1781
Magn03008885_Mmag_23014441	TVATVYGS	-GGRHLLIS--PGGT-	VANSAG	2 APGLVGRV	1 GYIVYAP	PSHISIRN	11 DRILAP	1851
orf271_BPSF121_5524054	TVATVYGS	-GGRHLLIS--DRNH-	PISQNT	2 APGLVGRV	1 GYIVYAP	PSHISIRN	11 DRILAP	1851
Vp2p27_BVP2_48696649	APVCTPTT	-GGRHLLIS--DKYAK	2 SKGIK	5 GGDGDS-	1 CKSHIA	1 PSVRDGE	7 LGDVPIR	1901
Consensus/70%hhhhssuh+hhhhhhhhuh+hhhhuh+hhhhuh+hhhhuh+hhhh	

Mediante otros alineamientos se localizó un dominio dedo de zinc en el extremo C-terminal de ccdc111. Este dominio es similar al que posee UL52, subunidad catalítica con actividad primasa del virus Herpes simplex 1 (HSV1), y otras AEPs. Otras muchas proteínas contienen también dominios dedo de zinc y aunque la combinación de cisteínas e histidinas que lo conforman puede ser muy diverso, en todas ellas está implicado en la unión a DNA. En el alineamiento múltiple de la [figura 13](#) se puede observar que los residuos críticos para la coordinación del átomo de zinc de varias primasas del tipo AEP son los aminoácidos más invariantes del alineamiento, lo que permite la identificación de los correspondientes a la proteína ccdc111: Cys⁴¹⁹, His⁴²⁶, Cys⁴⁴⁶ y Cys⁴⁵¹.

Secondary Structure	Str-1	Str-2	Str-3	Str-4	Str-5	Str-6	Str-7	Str-8		
DSR_VV_9791038	-----EEEEEE	EEEE-EEEE	-----EEEEEE	-----EEEEEE	-----EEEEEE	EEEE-EE	EEEE	-----EEEE		
ORFFP05 FPF 61228	261 FNDLDSNFTTV	PLVDYVPTV	ALCKK-RS	KHPHQHLS	LGNAIRYK	-----TGNPHS	RVKVI	GMKLFIQAQRILD	NSVLTTERGDY 347	
MSV089_MsEv 4049849	262 LKDIATNFTVT	PLDIYYATP	PNLCKK-VS	KHPHLLLS	NSDCIRYK	-----SGNPNR	SKIKT	GMKLFSISQIID	NVINVSORGEY 351	
AMV087_AMV 9964401	284 IKNLLETIENQ	DIYLTQTHA	CGK-TS	KNNHLYFN	QNNIOLIK	-----YGNRNR	GRIIK	PKLSDTAITKFKD	DIVRVKNKDLK 370	
MC094R_MCV 1492037	283 KHSALDIIID	INLIFNTPD	KICGKNSL	KNNRIKFT	QTKILFK	-----SGNPNR	NLTK	PTLSGYELANFIRD	NIKKIDSDAY 369	
A468R_PBCV 1620139	263 LHEFTEDNFTTT	PLLDYVPTV	ALCKK-SA	KHPHLLAL	LGNAIRYK	-----SGNPNR	RLKV	GMKLFIQAQRILD	NVINLTTERGDY 349	
FluV_V1_Aa_FluV 38683693	295 KISGVIRTEHV	YMFRTSKY	ANVE-RD	-----TSNAYF	RVTK	-----SGMKQC	YSRK	LCSC-----FRGD	VIKLPKKILIE 372	
ORF45_ESV 13177327	447 DVAVSRNLYV	NVAGVGSIT	NRNR-SE	-----SGNHNY	FWTK	-----EGAYQR	LSRK	KA-----YRSG	VIKLPSRAALK 347	
F1055L_ASFV 9628155	282 KNCFCIRVHKNI	LFKRTSPSY	RIKCK-RD	-----DKDNTL	LRVTCG	-----NKKYQR	RHDN	SL-----LMGS	TTNFVTVYDQ 356	
MIMI_R8_APMV 55818889	297 KQYSSKEGYNN	FNYDNRTK	PLSD-VIT	-----DSNGPY	VIEKS	-----SGGFLK	YSKK	HG-----KSMH	LGVDDETQGV 365	
MIMI_L794_APMV 55819660	297 FRINKNGNII	QLTRLSAK	PLSD-VIT	-----KSNAYL	LIKPIDIDQ	-----EYERIF	GYRQ	NLPF-----TIQK	THV----- 364	
CalHV3gp54_CahV 24943142	762 RVTFEP	TAANIV	CHPRGKSNF	PLR-VG	-----RNIA	SVRI	PLVLTHTSGV	TTVT	FMSC	FSGR 840
UL52_GHV2 9635087	986 SCCVVS	KDWILL	TIGRHGFT	PLR-VG	-----RASS	KNVV	PLVLYTSQA	ITVT	FMSC	FAGR 1070
UL52_HHV2 1869876	969 RRAVIR	KDWILL	RGALNQSLS	PLR-VG	-----GRAS	RATART	PLASVGTNN	LCASL	COCC	FATK 1051
EHV1gORF7_EHV1 50313248	997 HTVTVP	KDWILL	NAYSQGSF	PLR-VG	-----LRAS	AGLART	PLISADVHG	LCASIS	COCC	FATK 1081
HHV3gp07_HHV3 9625881	1000 KCIAIK	KDWILL	LICGTGFT	PLR-VG	-----RGRT	APART	PLSLVDHNN	LCISLA	COCC	FATK 1078
UL52_CeHV 11036606	985 KCIIVK	KDWILL	KTSGRGCT	PLR-VG	-----RGRT	APART	PLSLVDHNN	LCISLA	COCC	FATK 1068
UL52_PHV1 3450205	1204 DCIRVV	EGRICIA	MSGRSNTPT	PLR-VG	-----RGAS	QVTV	ASVVAVNSQG	PYAAL	QVTV	FATK 1291
HCMVUL70_HHV5 1780848	971 VLLPQ	PGACCV	-----DGA	TRDPRL	-----VT	-----RNPQ	QVTV	OLRTEHSY	LMASL	SRQ 1053
U43_HHV6 405161	778 QVTF	LKIDSKNI	-----QFGR	VSDPS	-----LN	-----RGNR	DNVVL	YQLKADGNR	LILIL	WST 859
ORF56_BHV4 12802583	761 YVVK	FLATGQNV	-----KPLK	SGNFRP	-----LT	-----RGKV	PTV	PLVPHIKEH	VITVT	FMSC 841
HHV4gp073_HHV4 9625608	582 HVTFEP	TGPNLV	CHARGRNFA	PLR-VG	-----FN	-----RASS	KNVV	PLVLYTSQA	ITVT	FMSC 841
GENE63_HV1 138079	582 KISPTT	SGSVRL	TPKMTDRDR	PLVHNR	-----EN	-----EQLE	FFTT	ARELKEADY	YLNFT	SDI 656
OshVlgORF7_OHV1 48696728	339 KNILP	VVDHNT	-----LIK	EEFRGK	-----INI	-----EN	-----EQLE	FFTT	ARELKEADY	YLNFT 425
OshVlgORF49_OHV1 48696769	296 TTPK	LEIEN	-----DKMK	IPGV	-----VTEI	-----RD	-----KDFI	QYFV	PLVLRGGY	YIHLK 372
MXC20.1_Atha 10177094	436 NVKPK	ICRWYF	-----VYSML	RSYR	-----EHIG	-----RD	-----KSNH	GTG	QPIYDIR	ARRGL 529
P0003809_27_Osat 50509466	435 NVSKG	ICRWYF	-----VYSML	RSYR	-----EHIG	-----RD	-----KSNH	GTG	QPIYDIR	ARRGL 511
cdg3_2760_Cpar 46228152	412 RQMFI	STMYF	-----ISVSK	NKML	-----FNIR	-----RD	-----ISNG	KIL	LIIDE	-----YK 489
PF14_0050_Pfal 23509271	956 SLI	KYVHSET	-----ITSK	DNKNEK	-----KMKK	-----RS	-----KSNH	IMVLSI	-----YK 1025	
FLJ33167_Hsap 22749373	392 GKGGK	RRNNYF	-----VYDI	KYRW	-----ENIG	-----RS	-----KSNH	IMVLSI	-----YK 470	
GSTEN0003504_G001_Anig 47219988	363 GIGGS	RRNNYF	-----VYDI	KYRW	-----ENIG	-----RS	-----KSNH	IMVLSI	-----YK 439	
MGC86034_Mmus 47564100	374 DIKGG	RRNNYF	-----VYDI	KYRW	-----ENIG	-----RS	-----KSNH	IMVLSI	-----YK 452	
LOC361147_Rnor 34878429	374 DTGGG	RRNNYF	-----VYDI	KYRW	-----ENIG	-----RS	-----KSNH	IMVLSI	-----YK 452	
LOC422549_Ggal 50746467	397 GVQGG	RRNNYF	-----VYDI	KYRW	-----ENIG	-----RS	-----KSNH	IMVLSI	-----YK 475	
LOC410586_Amei 48098405	312 IYPGK	ILCKYF	-----VYEL	LGTRY	-----ENID	-----RD	-----KSNH	IMVLSI	-----YK 388	
Consensus/80%p.....p.....p.....p.....p.....p.....p.....p.....p.....	

Figura 13. Alineamiento múltiple de la región con similitud al dedo de zinc localizado en el extremo C-terminal de AEPs de poxvirus, herpesvirus y de otros grandes virus citoplasmáticos. Entre las secuencias alineadas se incluye la correspondiente a *ccdc111* humana (indicada aquí como FLJ33167_Hsap-22749373). Los residuos responsables de la coordinación del átomo de zinc en algunas AEPs, así como aquellos para los que se predice la misma función, están sombreados en rojo. La figura ha sido modificada a partir de la publicada por Iyer *et al.*, 2005.

1.2 Conservación evolutiva

Para investigar la conservación evolutiva del gen *CCDC111* se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de sus ortólogos en eucariotas. La figura 14 resume en un árbol filogenético realizado mediante alineamientos múltiples con 70 secuencias homólogas, la presencia de la proteína *ccdc111* desde las células eucarióticas más sencillas, como *Ostreococcus* y *Micromonas*, conocidas como piceoeucariotas, hasta los organismos eucariotas superiores, tanto animales como plantas.

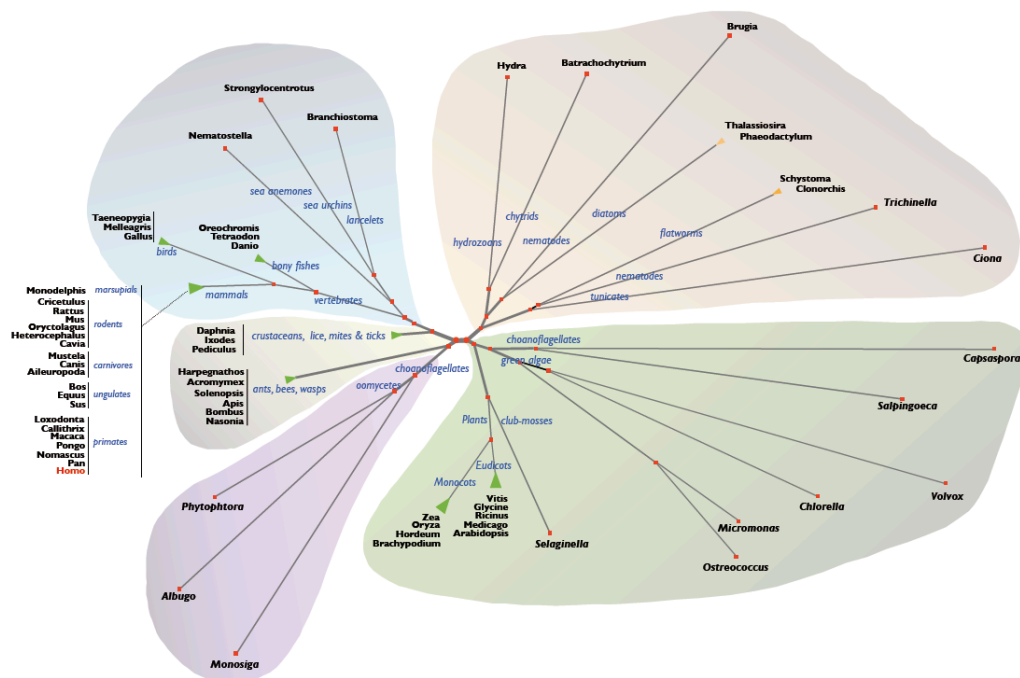


Figura 14. Árbol filogenético de los ortólogos identificados del gen *CCDC111*. Se muestra el género que posee el ortólogo en el extremo de cada rama del árbol. Hongos en violeta, plantas y algas en verde, nematodos en marrón, animales en azul y artrópodos en gris.

1.3 Clonaje, sobre-expresión y purificación de la proteína humana *ccdc111*

El cDNA correspondiente a la secuencia completa de la nueva posible primasa de humanos (*ccdc111*) se compró a *ImaGENES* (IRATp970B0285D; obtenido de la línea celular leiomiocarcinoma de útero). En primer lugar se intentó la sobre-expresión de la proteína WT clonada sin ningún *tag*. Esta construcción se introdujo en *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)-pLysS y BL21(DE3)-pRIL, obteniéndose en todos los casos un producto degradado de unos 30 kDa aproximadamente, lo que reveló la inestabilidad de la proteína. Para solventar el problema se realizó una construcción con una cola de histidinas (10xHis) en el extremo N-terminal de la proteína según se describe en Materiales y Métodos, lo que permitió estabilizar la proteína y facilitar la purificación. La sobre-expresión de la versión con histidinas en *E. coli* BL21(DE3) pRIL dio un producto de 67 kDa, que se correspondía con la predicción del peso molecular completo de la proteína *ccdc111* humana.

La expresión y purificación (ver Materiales y Métodos) fue llevada a cabo exactamente igual para la proteína WT y para todos los mutantes que aquí se describen. La fracción soluble de los extractos lisados obtenidos de células de *E. coli* se sometió a diferentes pasos de cromatografía (Ni-NTA y heparina), y se consiguió purificar la proteína ccdc111 humana, de forma soluble y con un buen rendimiento (Fig. 15).

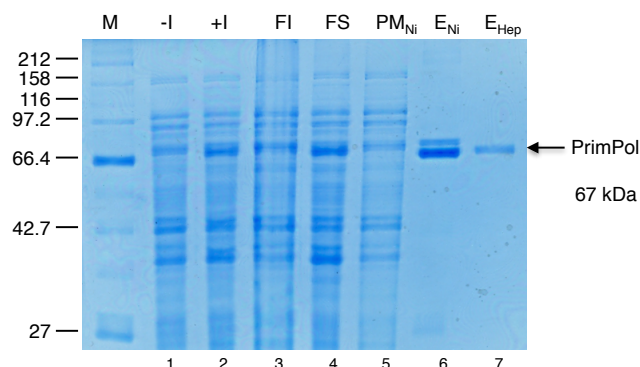


Figura 15. Sobreexpresión y purificación de la proteína ccdc111 humana en *E. coli*. Separación por electroforesis en un gel de PA-SDS y tinción con Azul de Coomassie de muestras correspondientes a los diferentes pasos de la purificación. M: marcador de peso molecular. -I: extracto celular no inducido. +I: extracto celular inducido. FI: fracción insoluble. FS: fracción soluble. PM_{Ni}: Paso de muestra de la columna Ni-NTA. E_{Ni}: Elución de la Ni-NTA y muestra de entrada de la Heparina. E_{Hep}: Elución de la Heparina.

2

***Actividad primasa de la
ccdc111 humana***

2.1 Detección temprana de la actividad primasa de *ccdc111* en el extracto celular obtenido tras su sobreproducción en *E. coli*

Como una primera aproximación de que el producto de expresión del gen humano CCDC111 es una primasa se ensayó si esta actividad se encontraba incrementada en un extracto de células de *E. coli* sobre-productoras de la proteína, frente a la actividad basal presente en un extracto celular control. Se usó M13cs como molde, una mezcla de ribonucleótidos (ATP, GTP, UTP, [α - 32 P]CTP), y en presencia de Mn^{2+} como cofactor (Fig. 16). Esta reacción se analizó en un gel nativo de agarosa de forma que los iniciadores formados se mantienen hibridados al DNA circular de cadena sencilla del fago M13, que ha servido como molde para su síntesis, migrando así en su misma posición. Esta reacción se pudo comparar más tarde con la llevada a cabo por la proteína *ccdc111*, ya purificada. La ausencia de señal en el extracto control indica que en estas condiciones la señal de fondo corresponde a la primasa de *E. coli* (DnaG), es indetectable (carril 2).

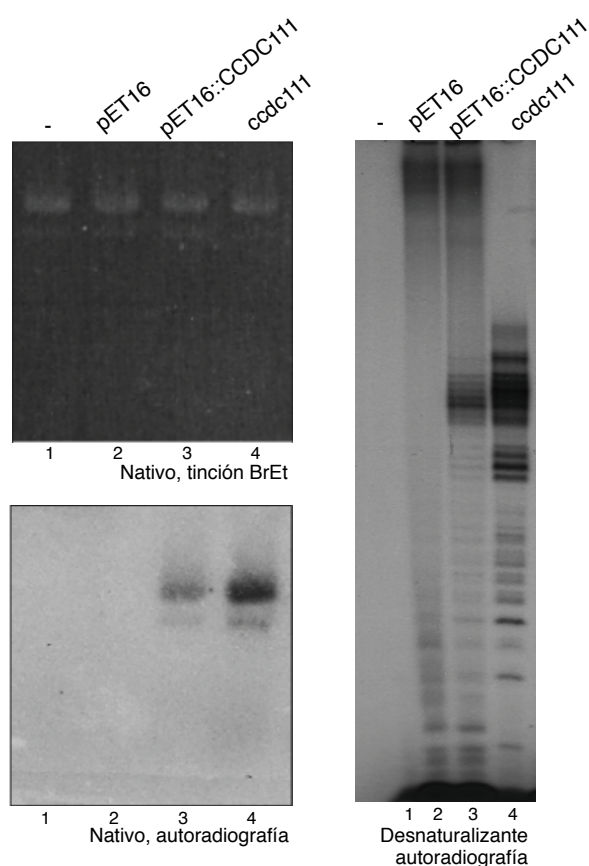


Figura 16. Ensayo de actividad primasa en extracto crudo. Ensayo primasa usando las células inducidas control (pET16), las células inducidas con la construcción recombinante (pET16::CCDC111) y la proteína purificada (*ccdc111*). Se resolvió en un gel nativo de agarosa (paneles de la izquierda) y en gel desnaturalizante, 20% acrilamida 8 M urea (panel de la derecha).

2.2 Ccdc111 tiene actividad primasa intrínseca

Una vez purificada la proteína *ccdc111* humana, el siguiente paso fue comprobar que efectivamente poseía actividad primasa. Se seleccionaron unas condiciones para evaluar la actividad primasa de forma convencional. Se utilizó un sustrato de DNA circular, M13cs, que permite descartar posibles extensiones del extremo 3' de moléculas lineales y que por tanto demuestra que los productos son fruto de la síntesis *de novo* catalizada por la enzima. Además, se añadió una mezcla de los cuatro ribonucleótidos (ATP, GTP, UTP y [α - 32 P]CTP) y Mn^{2+} como cofactor. Como se puede observar en el panel A de la figura 17 la proteína es capaz de sintetizar “*de novo*” una serie de oligonucleótidos de RNA, lo que define a una RNA primasa convencional. Para demostrar que esta actividad, y las siguientes descritas en este trabajo, son intrínsecas a la proteína se diseñó un mutante catalíticamente nulo. Para ello, el aspártico y glutámico del motivo DxE fueron sustituidos por

alanina, y se purificó la proteína mutante correspondiente, que fue denominada AxA. Como se puede observar en la [figura 17](#), este mutante carece de actividad RNA primasa. En un ensayo paralelo a este, llevamos a cabo la reacción en presencia de desoxirribonucleótidos (dATP, dGTP, TTP y [α - 32 P]dCTP) en lugar de ribonucleótidos. El resultado sorprendente fue la obtención de un patrón similar de síntesis “de *nov*o” de oligonucleótidos, en este caso de DNA ([Fig. 17B](#)), lo que se definiría como actividad DNA primasa. Esta actividad primasa no convencional también esta avalada por su ausencia en el mutante AxA.

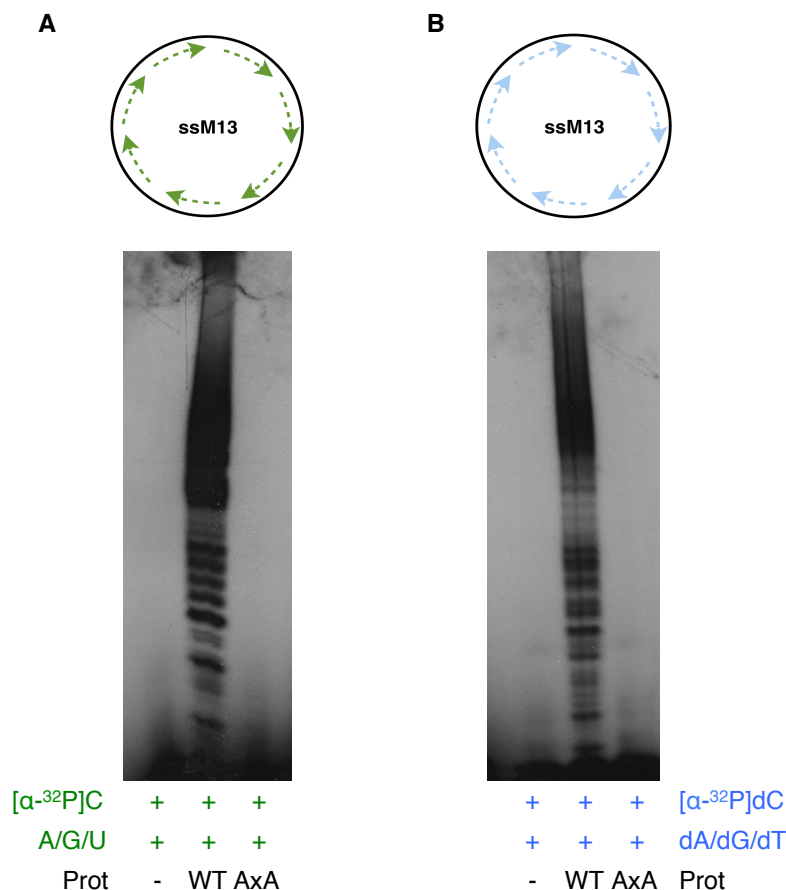


Figura 17. Actividad primasa usando ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Se muestra un esquema del ensayo primasa en la parte superior de cada panel. **A.** Iniciadores de RNA sintetizados por la proteína activa, WT (utilizando NTPs a 100 μ M y [α - 32 P]CTP a 16 nM) pero no por el mutante catalíticamente nulo, AxA. **B.** Iniciadores de DNA sintetizados de forma similar por la proteína ccdc111 (WT) (utilizando dNTPs a 100 μ M y [α - 32 P]dCTP a 16 nM). El análisis de los productos de la actividad primasa se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes.

Para la mayoría de las polimerasas existen señales (en el molde para las RNA polimerasas; una competición entre la unión al DNA y al nucleótido en el caso de las DNA polimerasas) que limitan la longitud del producto formado. Las primasas, con excepción de las primasas de arqueas, tienen una habilidad inherente de contar y por tanto de sintetizar iniciadores con un tamaño definido (Frick & Richardson, 2001). Al igual que ocurre con las primasas de arqueas, ccdc111 no muestra tener un mecanismo que implique contar y generar un producto de una determinada longitud, sino que es capaz de generar polinucleótidos de tamaños diferentes y relativamente grandes. Además algunas primasas de arqueas son también capaces, como ccdc111 humana, de incorporar eficientemente dNTPs de forma consecutiva, generando productos largos, tanto de RNA como de DNA, y actuando como un híbrido entre primasa y polimerasa, por lo que fueron denominadas PrimPol (Le Breton et al. 2007; Liu et al. 2001).

2.2.1 Uso de metales durante la reacción de primado por ccdc111

Hasta ahora hemos visto que la actividad primasa de ccdc111 requiere la presencia de iones manganeso, y que existe una actividad muy baja o indetectable cuando se utilizan iones magnesio.

Para comprobar que efectivamente la enzima es activada de forma selectiva por manganeso y no por magnesio se evaluaron rangos de concentración de ambos metales. Inicialmente, se ensayó la actividad primasa con NTPs y dNTPs en un rango de concentraciones de manganeso (0.5, 1, 2 y 5 mM) o de magnesio (1, 2, 5 y 10 mM). En el caso de la activación por Mn^{2+} el óptimo fue 1 mM para ambas reacciones (Fig. 18A y B, carriles izquierdos). La activación mediada por Mg^{2+} solo pudo ser observada cuando el ensayo se llevó a cabo usando dNTPs, mostrando un óptimo de 5 mM (Fig. 18B, carriles derechos), siendo este metal improductivo cuando se usaron NTPs (Fig. 18A, carriles derechos). Por tanto, estos primeros resultados indican que la eficiencia catalítica de la actividad primasa de la enzima se ve fuertemente estimulada por la presencia de iones Mn^{2+} como cofactores de la reacción. Más adelante se insistirá en este aspecto, en relación a la eficiencia catalítica de esta y otras actividades de *ccdc111* cuando se utilizan concentraciones fisiológicas de manganeso.

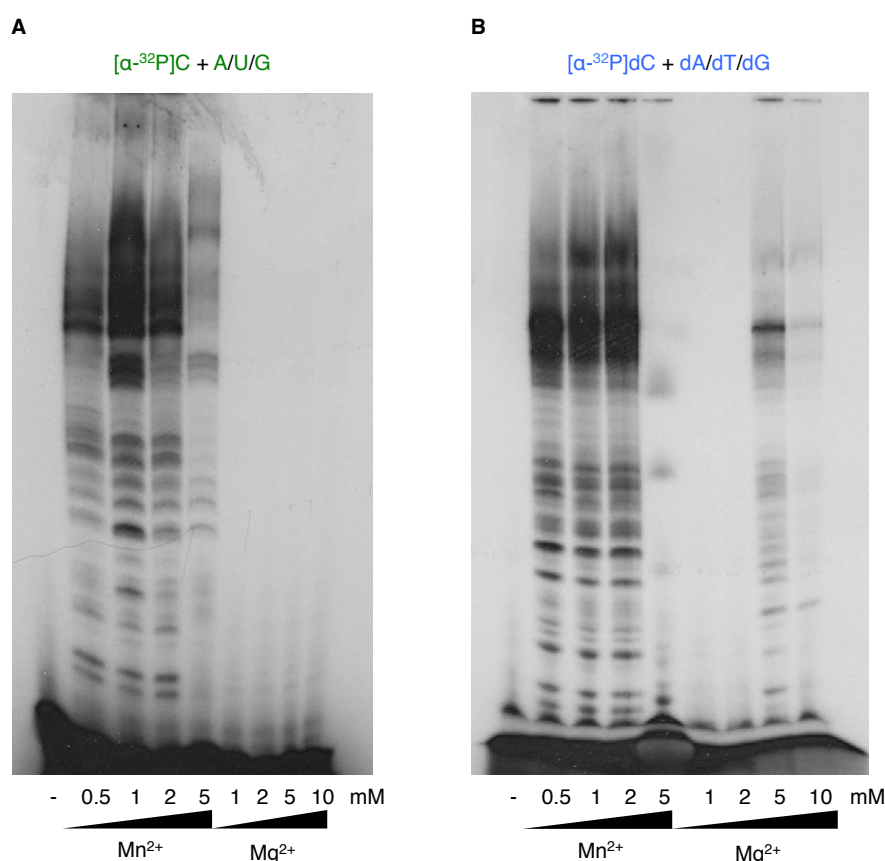


Figura 18. Óptimos de metal para la actividad primasa de *ccdc111*. A. Reacción primasa con NTPs mostrando un óptimo a 1 mM Mn^{2+} , y la ausencia de reacción con Mg^{2+} . B. Reacción primasa con dNTPs, idónea entre 0.5 y 2 mM Mn^{2+} , y detectable a 5 mM de Mg^{2+} .

2.3 Mecanismos de acción de *ccdc111* durante la iniciación

Las primasas convencionales catalizan la síntesis de oligorribonucleótidos en un mínimo de cinco pasos: unión al DNA molde, unión de los nucleótidos, iniciación, extensión hasta un iniciador funcional y transferencia del iniciador a la DNA polimerasa. Ha sido propuesto un mecanismo simple en el que se requieren dos sitios de unión al nucleótido en la proteína (Frick, Kumar, & Richardson, 1999). En este mecanismo (Fig. 19), el sitio del nucleótido que formará el extremo 5' del iniciador es denominado sitio de iniciación, y el del nucleótido que se irá añadiendo al extremo 3' del iniciador, se denomina sitio de elongación.

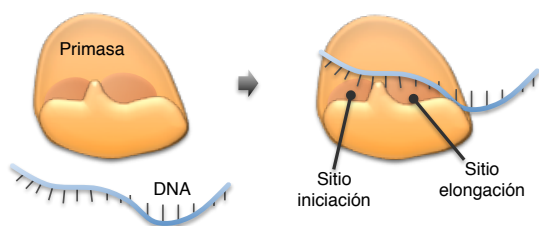


Figura 19. Centro activo de las primasas. Las primasas presentan dos sitios en su centro activo denominados sitio de iniciación o sitio 5' y sitio de elongación o sitio 3'.

2.3.1 Uso de secuencias de orígenes de replicación de HSV1

Como se ha mostrado anteriormente, el dominio de unión a zinc de ccdc111 muestra gran similitud con el de la primasa (UL52) de HSV1, quizás una de las primasas mejor estudiadas. UL52 se encarga de iniciar la replicación de este virus reconociendo una secuencia específica como señal de inicio de la síntesis. Se decidió usar sustratos con la secuencia de reconocimiento específica de UL52, (3'GTCC5' o 3'GCCCCA5') flanqueadas por colas de Ts (Cavanaugh & Robert D Kuchta 2009) (Tabla 3 y Fig. 20). En estos oligonucleótidos, la G forma parte de la secuencia señal de la iniciación de la síntesis pero no formará parte de la secuencia a copiar por la proteína.

Como puede verse en la figura 20, ccdc111 es capaz de sintetizar de forma muy eficiente iniciadores de RNA sobre estos moldes lo que lleva a pensar que reconoce la secuencia específica que contienen.

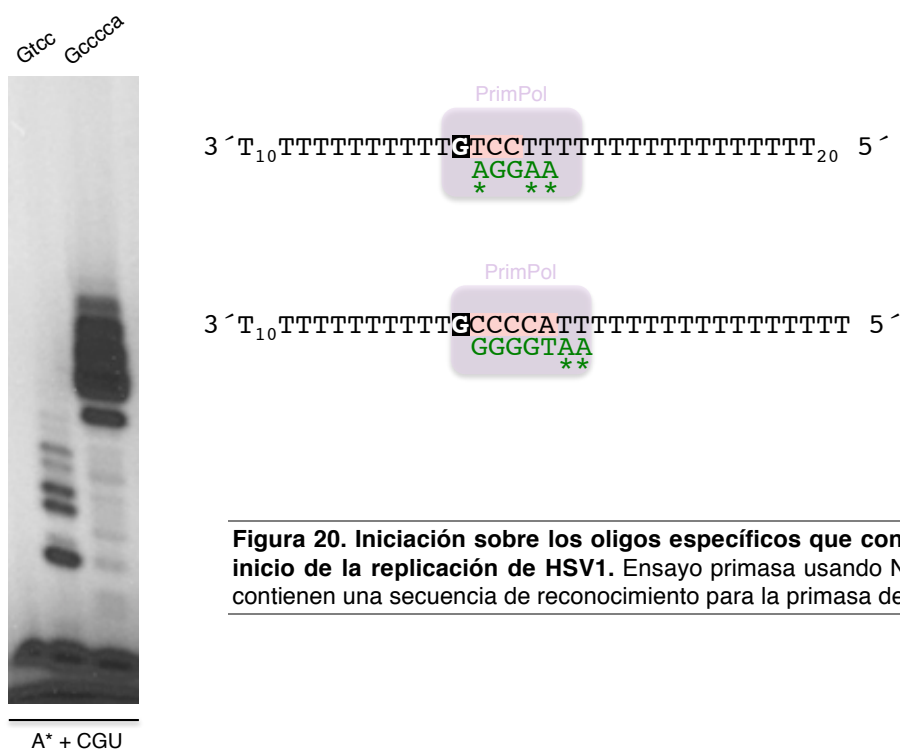


Figura 20. Iniciación sobre los oligos específicos que contienen secuencias de inicio de la replicación de HSV1. Ensayo primasa usando NTPs sobre moldes que contienen una secuencia de reconocimiento para la primasa de HSV1.

2.3.2 Actividad primasa dependiente de molde (mapeo del sitio de iniciación en oligos que contienen el origen de replicación de HSV1)

Se realizó un estudio sobre los moldes Gtcc y Gcccca para determinar el sitio exacto de inicio de la síntesis proporcionando las 6 posibles combinaciones de nucleótidos, teniendo siempre marcado uno de ellos: [α - 32 P]ATP (Fig. 21). Como se esperaba, la síntesis de los iniciadores fue dependiente de la secuencia molde, observándose el mismo patrón en los carriles que contienen los nucleótidos necesarios, complementarios a la secuencia. En el oligo Gtcc hay reacción en los carriles 2, 5 y 6 (Fig. 21A) que tienen en común la combinación A+G lo que significa que se está copiando la

secuencia 3'-TC-5'. En el caso del oligo Gcccca (Fig. 21B), únicamente con la combinación A+U+G se consigue un producto visible; en este caso son necesarios esos tres nucleótidos para copiar la secuencia de reconocimiento 3'-CCCCA-5' y continuar la síntesis frente a la cola de Ts (y de esta manera poder incorporar el nucleótido marcado [α - 32 P]ATP).

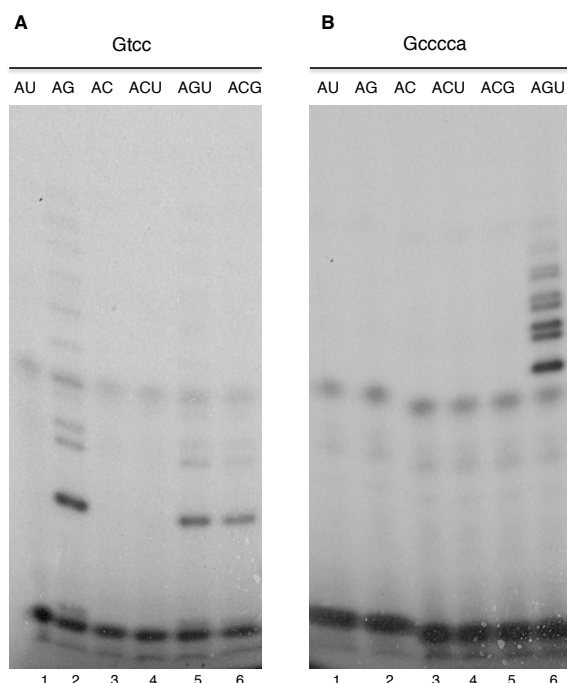


Figura 21. Mapeo de la secuencia de iniciación sobre los moldes Gtcc y Gcccca. Ensayo primasa hecho con combinaciones de dos y tres ribonucleótidos sobre los moldes Gtcc (A) y Gcccca (B); [α - 32 P]ATP (16 nM) y C, G, U (10 μ M).

Se llevó a cabo el mismo experimento de mapeo de sitio de inicio pero usando como sustratos desoxirribonucleótidos. En este caso los iniciadores de DNA sintetizados sobre el oligo Gtcc fueron marcados con [α - 32 P]dATP. En la figura 22 se puede observar que los carriles que contienen la combinación dA+dG presentan un resultado positivo, ya que se sintetizan iniciadores. Pero al contrario de lo que ocurría cuando se usaron ribonucleótidos, el uso de desoxinucleótidos promovió la incorporación incorrecta de estos frente al molde; esto se observa claramente en los carriles 5 y 6 donde se incorpora dC de forma errónea sobre el oligo Gtcc y da como resultado productos seguramente truncados, ya que como se demostrará más adelante la enzima ccdc111 no presenta capacidad de extensión de bases desapareadas.

En aquellos experimentos en los que se usa como nucleótido libre marcado radiactivamente un dNTP marcado en el fósforo alfa (por ejemplo [α - 32 P]dATP) se observa siempre la aparición de determinadas bandas inespecíficas (asteriscos en carril 2; Fig. 22). Estas bandas migran en una posición constante en un gel desnaturalizante (20 % PA, 8 M urea) y poseen una morfología ligeramente diferente a las bandas que realmente corresponden a un oligonucleótido formado de *ново*, siendo más redondeadas y difusas. Además, la aparición de estas bandas no es dependiente de molde sino que depende exclusivamente de la presencia de proteína y del nucleótido marcado en posición alfa, observándose un patrón de bandas específico para cada nucleótido marcado. En sucesivos esfuerzos por averiguar la naturaleza de dichos productos se evaluó la sensibilidad de los mismos a DNAsas, RNAsas y proteasas, siendo en todos los casos insensibles a los tratamientos (no mostrado). Esta observación ha sido constatada y clarificada para otras primasas (Chemnitz Galal et al. 2012), y se debe a una reacción que ocurre entre la primasa, el nucleótidos marcado y las moléculas de glicerol y Tris del tampón y que da lugar a los aductos marcados NMP-glicerol y NMP-Tris. En el caso de utilizar nucleótidos marcados en el fosfato gamma, los aductos producidos no

quedan marcados (se libera la marca cuando se produce la reacción) y por ese motivo las reacciones con este tipo de marcaje son más limpias.

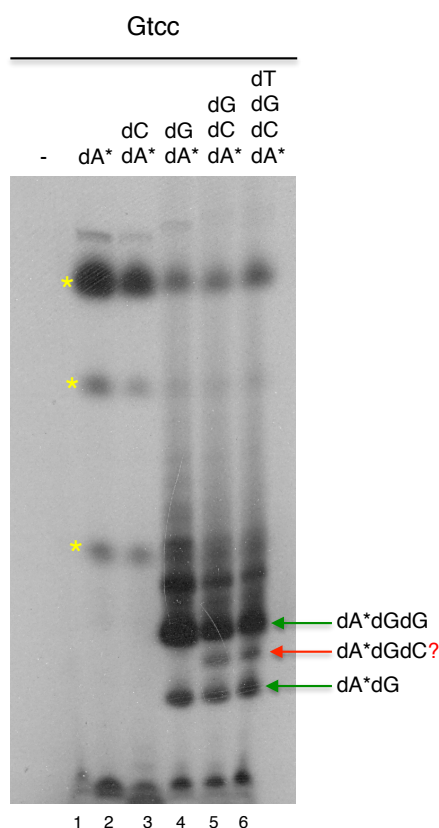


Figura 22. Mapeo de la secuencia de iniciación usando dNTPs. Ensayo primasa usando las posibles combinaciones de desoxirribonucleótidos, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (16 nM) y dC/ dG/ dT (10 μM). Se marcan en verde los productos que son fieles al molde y en rojo los que contienen errores.

2.3.3 Estudio de la formación del dinucleótido (especificidad de los sitios 5' y 3')

Según el modelo propuesto por , cuando la primasa se une al DNA los nucleótidos son unidos por la proteína en un orden en particular. Primero se une el nucleótido en el sitio de elongación (o sitio 3') de la primasa y posteriormente se une el nucleótido correspondiente a la posición del sitio 5' del iniciador (en el sitio de elongación).

Ya que se observó que esta enzima es capaz de usar como sustratos tanto ribonucleótidos como desoxinucleótidos se llevó a cabo un estudio más profundo de su capacidad para discriminar entre ambos azúcares y si esta era distinta para los sitios de iniciación 5' y 3' del iniciador. Estos experimentos se realizaron principalmente sobre el molde Gtcc para facilitar la visualización de productos tempranos de la iniciación (2-3 nt), ya que sobre el molde M13cs se observó un patrón muy variable alcanzando grandes tamaños en los iniciadores formados.

Así, sobre el molde Gtcc y en igualdad de condiciones de reacción, se evaluó el producto de iniciación de la primasa ya sea utilizando como sustratos ribonucleótidos ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ + GTP), desoxirribonucleótidos ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ + dGTP), o una mezcla de ambos ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ + GTP). La eficiencia de las reacciones mostradas en el panel central y derecho de la [figura 23](#) es similar y mayor que la observada en presencia de solo ribonucleótidos (panel izquierdo). Esto lleva a concluir en primera instancia una marcada preferencia de la proteína por los dNTPs frente a los NTPs. Por otra parte, el hecho de que determinada combinación de ambos sustratos resulte en una reacción similar a la observada con solo dNTPs dio pie a pensar que la diferencia en afinidad de la proteína por NTPs y dNTPs era específica para los sitios 5' y 3' del iniciador.

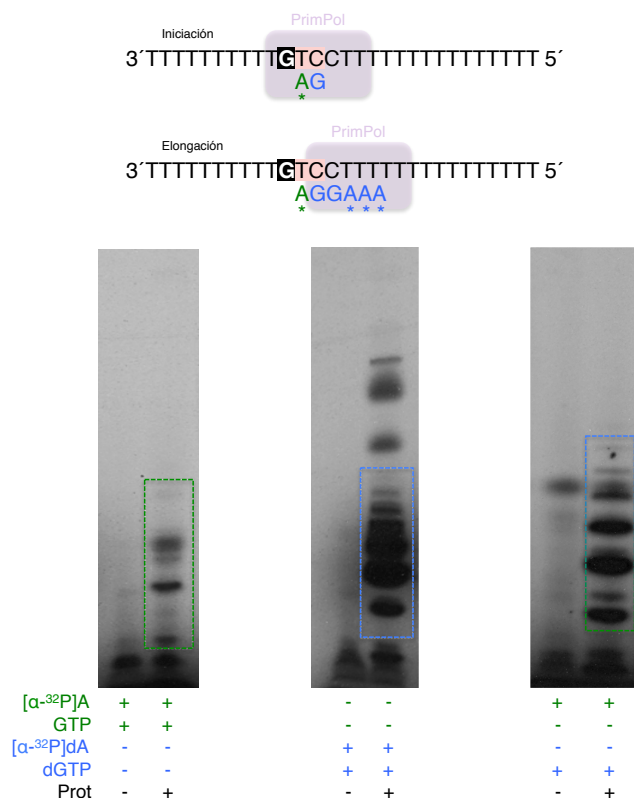


Figura 23. Eficiencia de primado con NTPs y dNTPs. Actividad primasa sobre el molde Gtcc con ribonucleótidos (panel izquierdo), desoxirribonucleótidos (panel central) y la combinación de ambos (panel derecho).

En los carriles 1-5 de la [figura 24](#) se utilizaron las condiciones anteriormente descritas, solo NTPs, solo dNTPs, o una mezcla de ambos. La comparación de los carriles 2, 3 y 4 permite observar la diferencia de movilidad que tiene el dinucleótido formado por pppA-G, pppA-dG y pppdA-dG debido al diferente peso molecular de los NTPs y dNTPs. Esto queda reflejado en un mayor retraso de la banda cuanto mayor contenido en NTPs tiene la misma. Como se comentó con anterioridad, la utilización de [γ - 32 P]ATP como nucleótido marcado (carriles 6-10) minimiza las reacciones espurias (anteriormente descritas) y además asegura que la marca es introducida solo en el primer nucleótido de la iniciación, de modo que toda reacción observable procede de la extensión de un dinucleótido que comenzó teniendo un NTP marcado en el sitio 5' del iniciador. En los carriles 7-10 se puede observar la extensión de los iniciadores formados (pppA-dG), a medida que se le añaden cantidades crecientes de dATP y se copia la secuencia molde. En el carril 8, correspondiente a una reacción que contiene igual cantidad de ATP que dATP, se produce una leve disminución de la marca en los productos de 2 y 3 nucleótidos, así como la aparición de nuevas bandas de diferente movilidad en posiciones superiores. En los carriles 9 y 10, en los que la concentración de dATP es 10 y 100 veces mayor que la del ATP, se observa la desaparición casi completa de la marca en los iniciadores nacientes de 2-3 nucleótidos acoplada a la aparición de bandas de gran tamaño que son producto de una buena extensión de esos pequeños iniciadores.

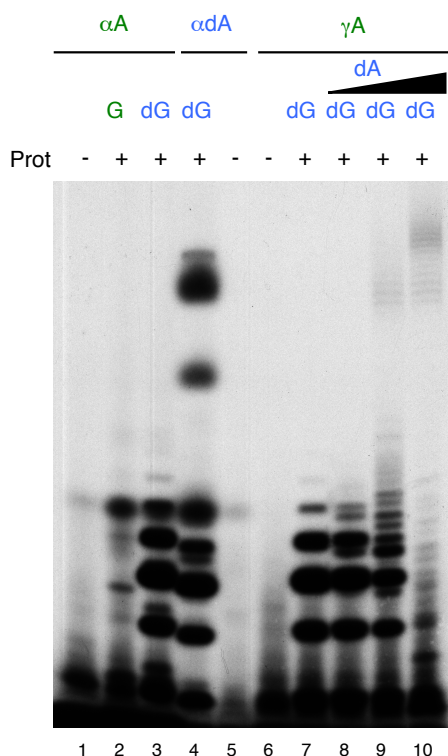


Figura 24. Actividad primasa: combinación de NTPs y dNTPs. Ensayo primasa usando como molde el oligo Gtcc y diferentes combinaciones de NTPs y dNTPs para el primer y segundo lugar del iniciador. El nucleótido marcado está a 16 nM y G/dG a 10 μ M, el dATP se proporciona a 16 nM, 160 nM y 1,6 μ M.

A continuación, se procedió a realizar una serie de experimentos usando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ o $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$. En la [figura 25A](#) se mantuvo una concentración constante de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y variable de dATP. La lectura de este experimento es exactamente igual al anterior: no existe un marcaje mayor de ningún producto de iniciación o extensión de los mismos lo que lleva a pensar que el ribonucleótido está siendo incorporado exclusivamente en la primera posición del iniciador no siendo éste capaz de competir con el dATP por el sitio 3' del iniciador (sitio de elongación).

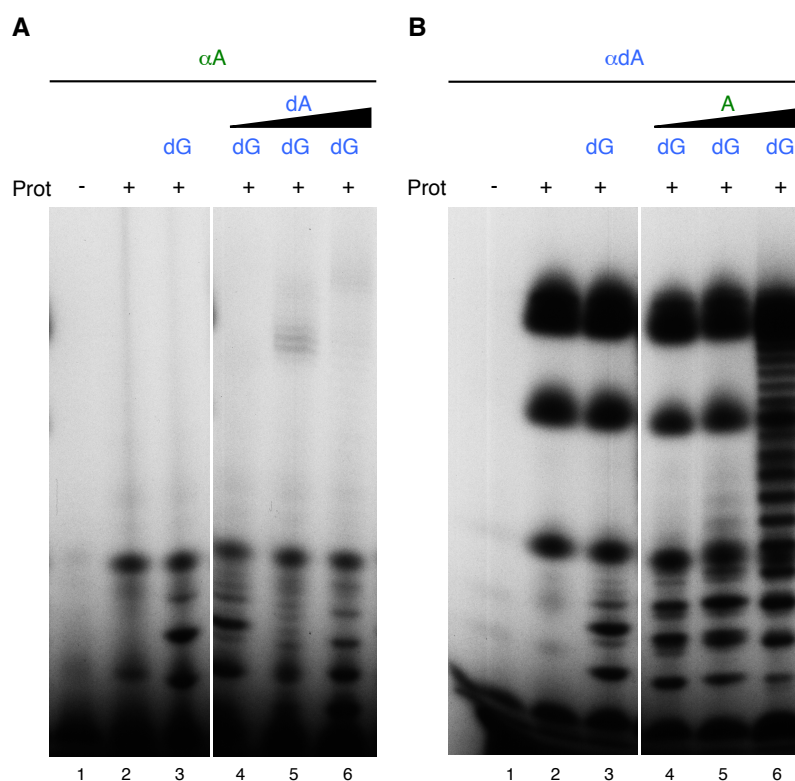


Figura 25. Competición entre NTPs y dNTPs en la primera posición del iniciador. A. Con una concentración fija de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dGTP (10 μM) se añade dATP a 16 nM, 160 nM y 1,6 μM . **B.** Con una concentración fija de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (16 nM) y dGTP (10 μM) se añade ATP a 16 nM, 160 nM y 1,6 μM .

A continuación se realizó el mismo experimento de competición pero manteniendo una concentración constante de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ e incrementando de forma progresiva el ATP (Fig. 25B). En estas condiciones solo se observó efecto de la adición del ATP cuando su concentración fue 100 veces mayor que la del dATP (carril 6), marcándose una multitud de bandas de extensión de los iniciadores. Dado que la concentración del dATP es constante, la ganancia de eficiencia de la actividad primasa se debe a la adición de ATP (x100). Como ya se ha demostrado, el ATP no compete con el dATP para la elongación del iniciador pero sí para su formación inicial, de modo que la alta concentración de ATP favorece el número de iniciaciones (dinucleótidos formados), favoreciendo el mayor marcaje con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ durante la elongación.

De los experimentos anteriores se concluye que *ccdc111* tiene igual afinidad por NTPs y dNTPs en el sitio 5' del iniciador, y que tiene una preferencia 100 veces mayor por dNTPs durante la elongación. A continuación nos preguntamos si esta preferencia por los dNTPs se restringía a la fase de extensión de los iniciadores ya formados o si se podía ver reflejada ya en la formación del dinucleótido (debido a la incorporación en el sitio 3' de este). Para ello se midió la actividad primasa sobre el molde Gtcc, manteniendo constante la concentración del primer nucleótido (ya se trate de ATP o dATP) y variando la concentración de GTP o dGTP como segundo nucleótido (Fig. 26). Cuando el segundo nucleótido es un desoxirribonucleótido (dGTP), la reacción obtenida con un NTP o un dNTP en primera posición fue igualmente eficiente (Fig. 26A). En el caso en el que el segundo nucleótido es un ribonucleótido (GTP), la reacción con un desoxirribonucleótido en primera posición no fue posible aunque sí funcionó la combinación con otro ribonucleótido (Fig. 26B).

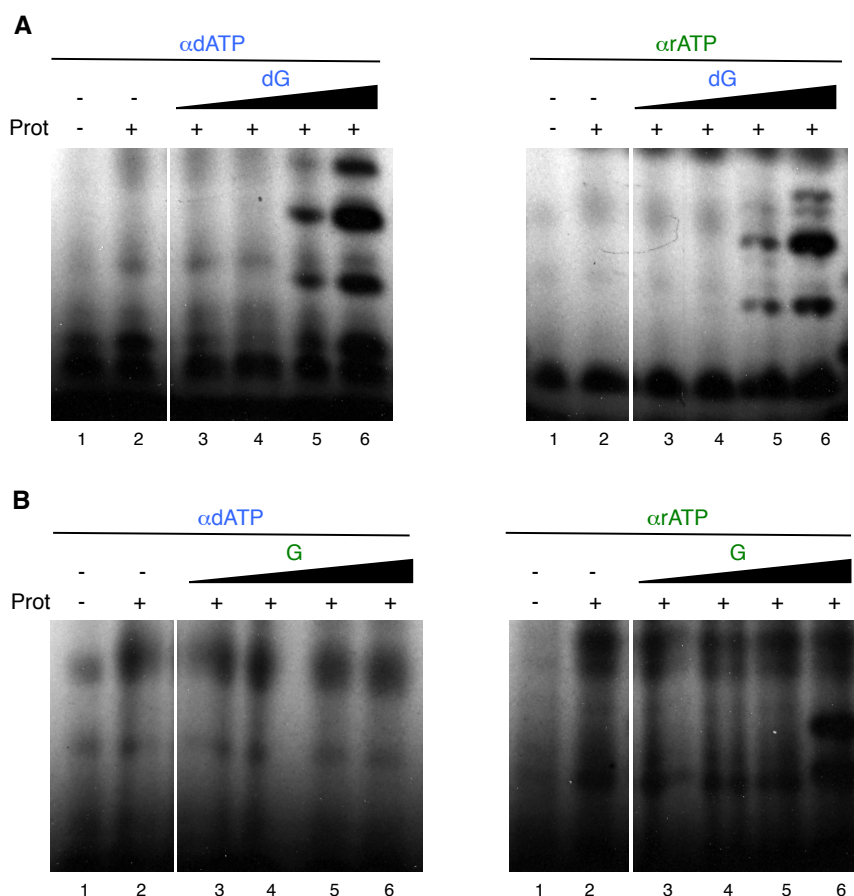


Figura 26. Afinidad por NTPs y dNTPs para la segunda posición del iniciador. A. Para la primera posición del iniciador se proporciona $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ o $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y concentraciones crecientes de dGTP (0.1, 1, 10, 100 μM). **B.** Para la primera posición del iniciador se proporciona $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ o $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y concentraciones crecientes de GTP (10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM).

2.3.4 La síntesis del dinucleótido es el paso limitante

Después de unir el DNA, las primasas unen los nucleótidos para generar el complejo cuaternario: proteína-DNA-NTP-NTP. La K_M de las primasas por los primeros nucleótidos de la iniciación es usualmente alta, entre 20 μM y 1 mM (Ramirez-Aguilar & Kuchta, 2004; Ramirez-Aguilar, Low-Nam, & Kuchta, 2002; Sheaff & Kuchta, 1993; Swart & Griep, 1995; Tseng & Ahlem, 1983). El paso que limita la tasa de síntesis ocurre después de la unión del nucleótido y antes o durante la síntesis del dinucleótido. En ambos casos, los dinucleótidos no se acumulan antes de la formación de productos más largos, como podía ocurrir si el paso limitante ocurriese tras la formación del dinucleótido. Este hecho, general para las primasas, se constata para ccdc111 en una cinética de reacción de tiempo sobre el oligo Gtcc, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, dGTP y Mn^{2+} (Fig. 27). Aunque en este tipo de ensayo las condiciones no favorecen la elongación de los iniciadores formados estos sí son de un tamaño superior a dos nucleótidos.

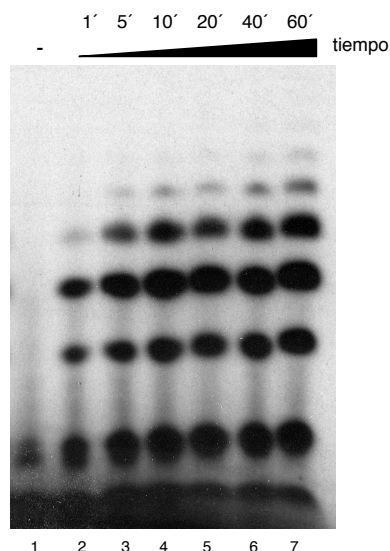


Figura 27. Cinética del ensayo primasa sobre el molde Gtcc. Se realizó un ensayo primasa con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dGTP (10 μM) y se paró con tampón de carga a los diferentes tiempos que se detallan en la figura.

2.3.5 Uso de análogos de nucleótidos en el extremo 5' del iniciador

Después de unir el DNA molde, las primasas deben unir dos nucleótidos para catalizar la formación del dinucleótido y liberar el pirofosfato inorgánico. Únicamente el nucleótido incorporado en el extremo 5' del iniciador conservará su trifosfato tras la reacción. La mayoría de las primasas muestran una baja discriminación respecto al trifosfato del nucleótido incorporado en el extremo 5' del iniciador. Por ello, análogos de nucleótidos con modificaciones en el grupo 5' fosfato e incluso nucleótidos unidos a proteínas a través de su 5' fosfato, pueden ser incorporados en la posición 5' del iniciador (Frick et al., 1999; Godson, Mustaev, & Sun, 1998; Kusakabe & Richardson, 1997; Mustaev & Godson, 1995).

Se decidió evaluar la capacidad de ccdc111 para usar una serie de nucleótidos modificados en el extremo 5' fosfato como primer nucleótido del iniciador. Para ello se realizaron ensayos primasa sobre el oligo Gtcc, usando una concentración constante de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ como segundo nucleótido (nucleótido del sitio 3' del iniciador) y un rango de concentración de diferentes nucleótidos modificados (ADP, AMP-PNP, ATP γ S), llevando como control ATP. Como puede observarse en la

figura 28 ccdc111 fue capaz de utilizar todos ellos como nucleótido para el sitio 5' del iniciador (la reacción se señaliza con *), lo que demuestra la no necesidad de un trifosfato de forma estricta en esa posición.

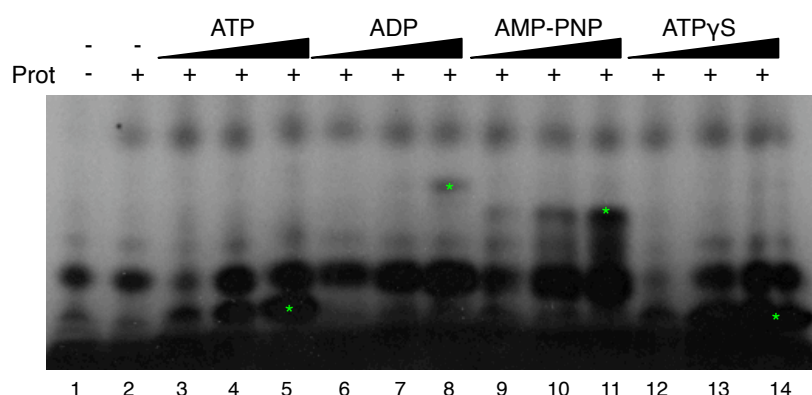


Figura 28. Uso de análogos de nucleótidos para la primera posición del iniciador. Se realizó un ensayo primasa sobre el molde Gtcc usando de forma constante $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ (16 nM) y ATP, ADP, AMP-PNP y ATP γ S a concentraciones crecientes (1, 10 y 100 μM).

2.3.6 Uso de metales durante la síntesis del iniciador

El estudio detallado de la formación del dinucleótido por ccdc111 se ha llevado a cabo usando Mn^{2+} como activador ya que, como se demostró anteriormente, este metal estimula de forma significativa la actividad primasa de la enzima.

Para corroborar que los resultados obtenidos en cuanto a la especificidad de nucleótido del sitio 5' del centro catalítico de ccdc111 se mantiene independientemente del metal activador utilizado, se realizaron ensayos en un rango de concentración de Mn^{2+} y Mg^{2+} . Se ensayó la actividad primasa sobre el molde Gtcc usando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ o $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ como nucleótido 5', y dGTP como nucleótido 3' (Fig. 29). A todas las concentraciones de Mn^{2+} ensayadas se observó un nivel muy similar de actividad, independientemente de la naturaleza (ribo o deoxi) del nucleótido 5'; sin embargo, en ninguna de las concentraciones de Mg^{2+} ensayadas se logró detectar actividad primasa.

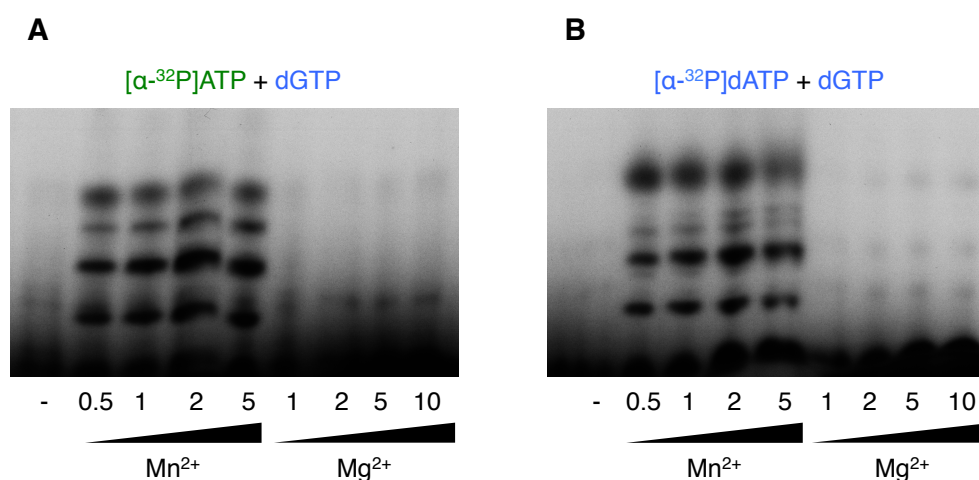


Figura 29. El manganeso es el metal activador preferido para sintetizar iniciadores sobre el molde Gtcc. **A.** Ensayo primasa sobre el molde Gtcc usando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dGTP (10 μM) a las diferentes concentraciones de Mn^{2+} y Mg^{2+} que se indican. **B.** Ensayo primasa sobre el molde Gtcc usando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (16 nM) y dGTP (10 μM) a las diferentes concentraciones de Mn^{2+} y Mg^{2+} que se indican.

Figura 30. Formación de dinucleótidos preferidos sobre M13cs. **A.** Ensayo primasa sobre M13cs utilizando combinaciones de dos desoxirribonucleótidos (dNTP marcado radiactivamente a 16 nM y el resto de dNTPs a 10 μ M). **B.** Ensayo primasa sobre M13cs utilizando combinaciones de dos nucleótidos, un ribonucleótido y un desoxirribonucleótido. Los esquemas inferiores muestran la secuencia de los dinucleótidos formados (dNTP marcado radiactivamente a 16 nM y el resto de NTPs a 100 μ M).

Una vez conocido que el primer nucleótido del dímero es una purina, y que en esta posición pueden incorporarse tanto NTPs como dNTPs con la misma eficacia, se pudo explicar una observación previa. Se había observado que cuando en un ensayo de primasa sobre M13cs realizado con una mezcla de todos los dNTPs se suplementaba con ATP o GTP a una concentración alta (1 mM), se estimulaba enormemente la actividad de la enzima (Fig. 31). Esto se puede explicar ahora por el hecho de que el exceso de ATP o GTP (válidos como primer nucleótido del dímero) favorece la formación de una gran cantidad de iniciadores, y consecuentemente su extensión posterior por los dNTPs. Esto no se observó cuando se suplementaba con dATP o dGTP, ya que estos casos lo que se observó principalmente fue un cambio del patrón de la síntesis de los iniciadores, lo que puede estar promovido por la descompensación de la concentración de los 4 dNTPs.

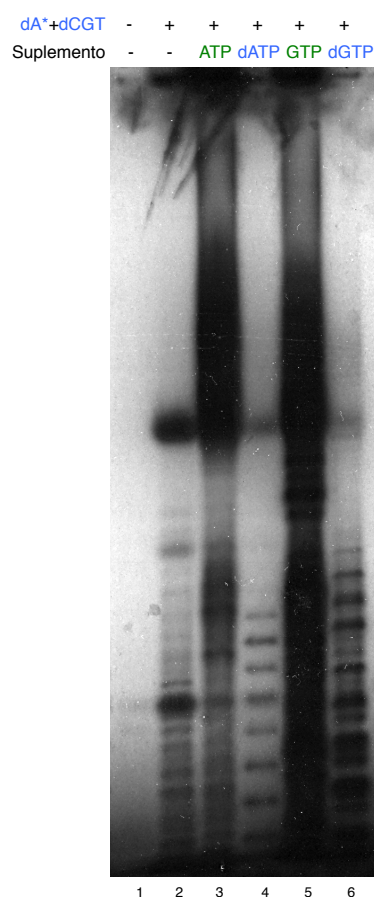


Figura 31. Estimulación de la iniciación mediada por un exceso de NTPs del tipo purina. Ensayo primasa sobre el molde M13cs empleando [α - 32 P]dATP (16 nM) y dCGT (10 μ M). La reacción se complementa con ATP, dATP, GTP o dGTP a 1 mM.

2.4.2 Mutaciones sobre una secuencia de reconocimiento válida

Hasta el momento conocemos la afinidad o preferencia de ccdc111 por los sustratos nucleotídicos correspondientes a los sitios de iniciación (5') y elongación (3'), y por tanto hemos averiguado las incógnitas N₁ y N₂ de la secuencia molde reconocida por ccdc111, siendo N₁ una pirimidina y N₂ cualquier nucleótido.

Para averiguar la X de la ecuación del trinucleótido de reconocimiento, 3'-XN₁N₂-5' definido en primasas convencionales, volvimos a usar el oligo Gtcc ya que cumple con el consenso: pirimidina + cualquier nucleótido (Pir·N) y cambiamos la G por A, T, y C. Como se puede observar en la [figura 32A](#) el cambio de la G provoca una gran disminución de la capacidad de ccdc111 para sintetizar iniciadores de una longitud mayor al dinucleótido. Si las condiciones son un poco más restrictivas, bajando la concentración del segundo nucleótido ([Fig. 32B](#)), la actividad primasa desaparece casi por completo en ausencia de la G en la secuencia.

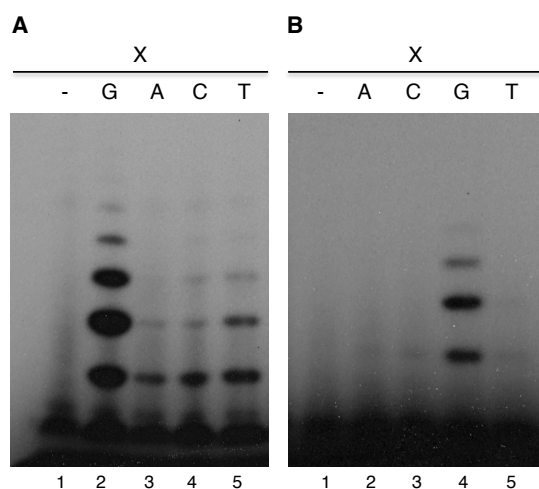
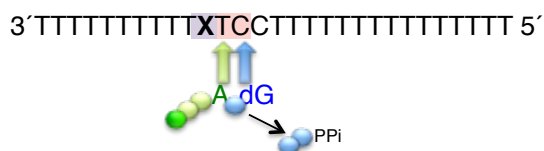


Figura 32. Identificación de G como el nucleótido críptico. **A.** Ensayo primasa sobre diferentes moldes derivados del oligo Gtcc empleando [γ -³²P]ATP (16 nM) y dGTP (10 μ M). **B.** Ensayo primasa sobre estos mismos moldes empleando [γ -³²P]ATP (16 nM) y dGTP (1 μ M).

Por tanto concluimos que el nucleótido X es importante para el reconocimiento de la secuencia que permite la formación del dinucleótido iniciador; a esta base que no es copiada, se le denomina nucleótido “críptico”. Para averiguar si el requerimiento de este nucleótido “críptico” está presente ya desde la unión de ccdc111 al DNA se realizó un ensayo de retraso en gel. Se analizó la capacidad de unión a dos moldes de los anteriormente evaluados, el Gtcc y el Atcc, que daban resultados opuestos en cuanto a la actividad primasa de la enzima. El cambio de G por A en el molde no se vio reflejado en una diferencia de unión por parte de la proteína al DNA ([Fig. 33](#)).

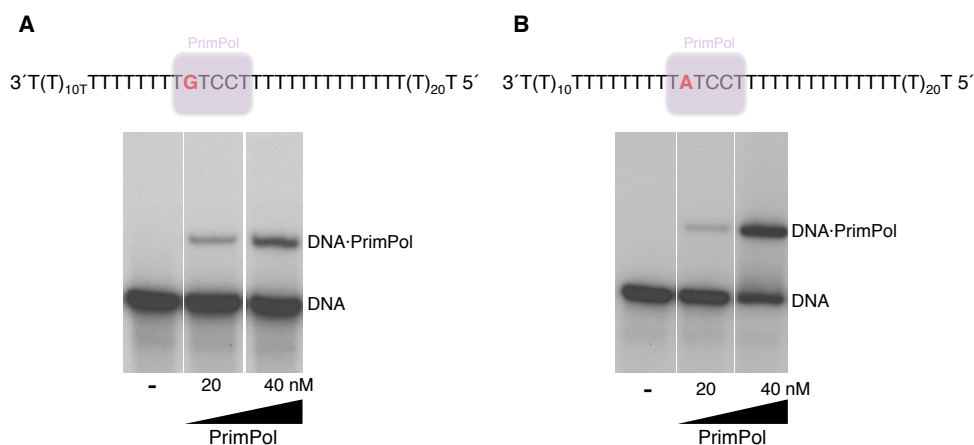


Figura 33. Unión de ccdc111 al DNA y dependencia de la secuencia de reconocimiento. Ensayo de retraso en gel para evaluar la unión diferencial o no de la proteína al sustrato Gtcc (**A**) y Atcc (**B**).

Por tanto el efecto negativo sobre la actividad primasa al no existir en el molde una G como nucleótido críptico no es fruto de una mala unión de ccdc111 a ese molde, sino que podría estar afectando algún paso de reconocimiento o posicionamiento de la secuencia directora, posterior a la formación del complejo binario DNA-proteína.

Con el fin de estudiar en más detalle la secuencia de reconocimiento de ccdc111 se realizaron multitud de cambios en la secuencia 3'-GTCC-5', en las posiciones N₂, N₁, X, N₁, N₂ y N₃ (Tabla 4 y). El gráfico de la figura 34 resume y cuantifica los resultados obtenidos de los ensayos primasa con todos estos oligos, corroborando que la secuencia de reconocimiento favorita por esta proteína es 3'-G·Pir·N-5'.

Oligo (3'-5')	Resultado	Triplete reconocido
T ₁₀ -GTCC-T ₁₅	+	GTC
T ₁₀ -GCCCCA-T ₁₇	+	GCC
T ₁₀ -ATCC-T ₁₅	-	
T ₁₀ -CTCC-T ₁₅	-	
T ₁₀ -TTCC-T ₁₅	-	
T ₁₀ -GCTC-T ₁₅	-	
T ₁₀ -GATC-T ₁₅	-	
T ₁₀ -GTAC-T ₁₅	+	GTA
T ₁₀ -GTCA-T ₁₅	+	GTC
T ₄ -GTTC-T ₁₅	+	GTT
T ₄ -GTCG-T ₁₅	+	GTC
T ₄ -GTCT-T ₁₅	+	GTC
T ₄ -CTCA-T ₁₅	+	TCA
T ₄ -ATCA-T ₁₅	-	
T ₁₀ -TTCA-T ₁₅	-	
T ₄ -GTTA-T ₁₅	-	
T ₄ -GTGA-T ₁₅	-	
T ₁₀ -GATC-T ₁₅	-	
T ₁₀ -GCTC-T ₁₅	-	
T ₁₀ -GTGC-T ₁₅	-	

Tabla 4. Variaciones en las posiciones X, N₁, N₂ y N₃ del oligo Gtcc. Resultados de los ensayos de actividad primasa de ccdc111 sobre los oligos con modificaciones de la secuencia GTCC.

Oligo N ₂ N ₁ GTCC	Resultado
TTGTCC	+
ATGTCC	+
CTGTCC	+
GTGTCC	+

Tabla 5. Variaciones en las posiciones N₂ y N₁ del oligo Gtcc. Resultados de los ensayos de actividad primasa de ccdc111 sobre los oligos con modificaciones en el 3' de la secuencia GTCC.

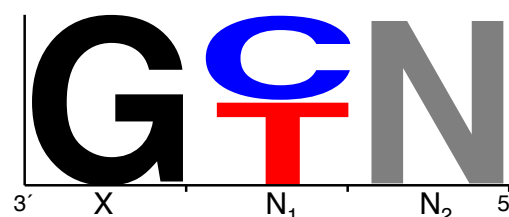
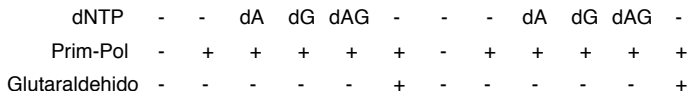
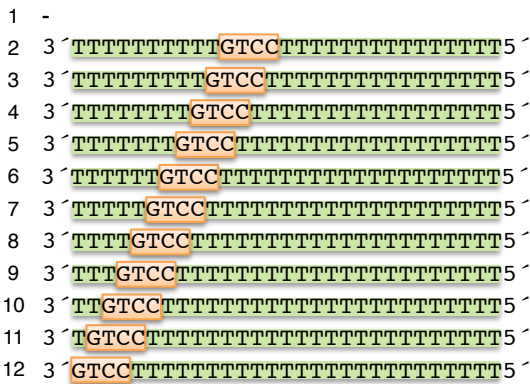


Figura 34. Gráfico resumen de la secuencia de reconocimiento favorita para la iniciación por ccdc111. El resultado de multitud de ensayos primasa sobre variaciones en la secuencia 3'GTC5' se refleja en el gráfico.

Se quiso evaluar si el contexto que rodea a la secuencia señal (GTC, en este caso) tenía también un efecto sobre la actividad primasa, de modo que se estudió el efecto del tamaño total del oligo y el cambio de las colas Ts que lo flanquean. A lo largo de este trabajo se usan dos versiones del oligo Gtcc, uno tiene una longitud de 60 nt y el otro 29 nt. Se pudo observar una diferencia en la actividad primasa de ccdc111 dependiente del tamaño del DNA molde (Fig. 35A). Cuando se evaluó la capacidad de unión de la proteína a ambos moldes, la diferencia de tamaño fue mucho más crítica para la detección de un complejo estable proteína-DNA. Así, no se pudo observar la unión de la





Otro hecho relacionado con el contexto que rodea a la secuencia específica de iniciación son las colas poli-T que la flanquean. Es conocido que las primasas eucarióticas tienen mayor afinidad por las secuencias ricas en pirimidinas (Holmes et al. 1985), de modo que decidimos cambiar esas colas de Ts por colas de As y ver si la capacidad de iniciar la síntesis se mantenía. Se diseñaron varios oligos que teniendo colas de As de diferentes longitudes mantuviesen la secuencia 3'-GT-5', y otra serie donde la G es sustituida por las otras tres posibilidades (Fig. 37). En todos los casos se pierde la actividad primasa observada anteriormente debido al cambio de Ts por As.

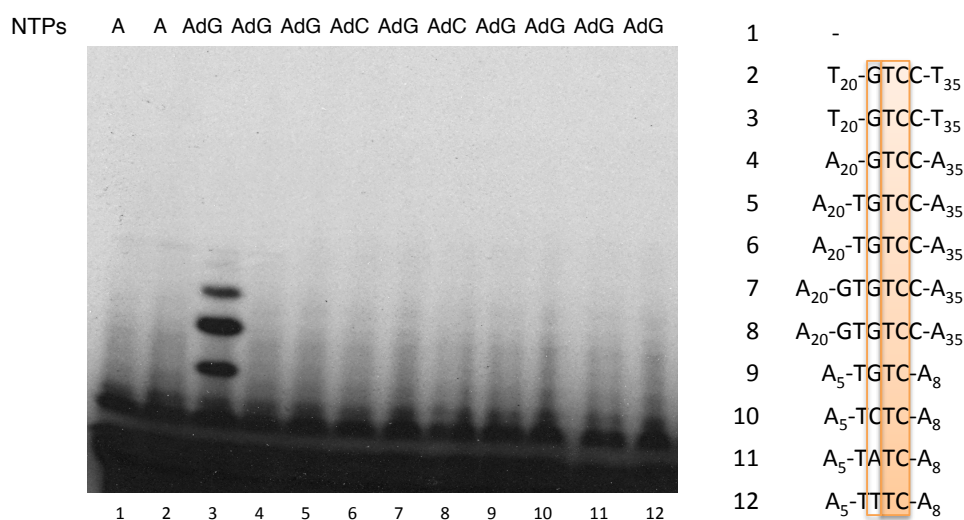


Figura 37. Actividad primasa sobre moldes con colas de As en lugar de Ts. Ensayo primasa sobre una serie de moldes que contienen secuencias potencialmente señalizadoras de la iniciación flanqueadas por colas de As, se lleva como control positivo el Gtcc con colas de Ts. El ensayo se llevó a cabo empleando [γ -³²P]ATP (16 nM) y un dNTP a 10 μ M.

El hecho de que la proteína tenga mayor afinidad por moldes ricos en pirimidinas y que el inicio de la síntesis del iniciador comience usando preferentemente purinas, asemeja la especificidad de iniciación de ccdc111 a la de las primasas eucarióticas.

2.4.3 Actividad primasa sobre oligos de secuencia heterogénea

Para estudiar el contexto de secuencia de una forma más arbitraria, seleccionamos una colección de oligonucleótidos como molde para dirigir la formación de los 4 posibles dinucleótidos A-dN. Como se puede observar en la figura 38, se detectó actividad primasa con todos los oligos ensayados (carriles 4 al 11), si bien los oligos más eficaces como molde fueron los oligos 4, 5, 10 y 11, aunque con una actividad significativamente menor que la observada con el oligo Gtcc (carril 3).

Una inspección de las secuencias, que habían sido elegidas al azar, no demuestra una correlación clara entre una mejor actividad y la presencia de una secuencia particular dentro del consenso GTN como favorito para iniciar la síntesis por ccdc111.

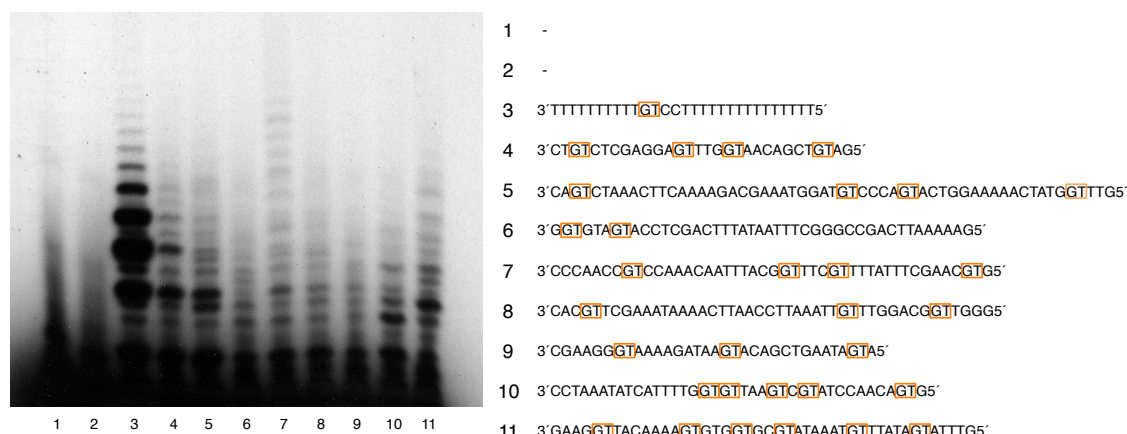


Figura 38. Primado sobre una selección de oligos de secuencia heterogénea. Actividad primasa sobre los moldes de cadena sencilla cuya secuencia se especifica a la derecha (posibles sitios de iniciación subrayados). El ensayo se realizó usando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dCGT (10 μM).

2.5 La actividad primasa de *ccdc111* requiere reconocer el molde como cadena sencilla de DNA

Las primasas interaccionan frecuentemente con helicasas, y hay casos en los que se asocian como dominios estructurales de un mismo polipéptido. Las helicasas desenrollan y separan el DNA usando la energía derivada de la hidrólisis de los NTPs. Se estudió la secuencia aminoacídica de *ccdc111* en busca de motivos tipo Walker A y Walker B, y otros característicos de helicasas y no se localizaron en la secuencia. Se realizó también un ensayo ATPasa, que dio un resultado negativo como era de esperar (no se muestra).

Por otra parte se estudió la posibilidad de que *ccdc111* pudiese activar su primasa cuando su secuencia señal favorita estuviese formando parte, total o parcialmente, de una doble cadena de DNA. Obviamente, para ello sería necesaria la apertura de la doble hélice, una función similar a la que llevan a cabo las proteínas iniciadoras de la replicación. Para ello se hibridaron oligonucleótidos de forma que la secuencia de reconocimiento quedase “oculta” como doble cadena, o parcialmente “abierta”. En la [figura 39B](#) se puede observar cómo la reacción se reduce drásticamente cuando la secuencia 3'-GTCC-5' queda oculta en forma de cadena doble (carriles 5 y 7). Asimismo, la reacción resulta empeorada cuando la secuencia GTCC y la cola de Ts en la región 3' se encuentra en cadena sencilla (carril 3). Esta bajada puede ser debida realmente al impedimento estérico que puede ocasionar una cadena doble de DNA adyacente o a que este oligo poliA no hibride justo como se muestra en la imagen sino que lo haga de forma que oculte la secuencia señal. De acuerdo con esa posibilidad, el oligo 10, que deja únicamente la secuencia GTCC en forma de cadena sencilla, fue inactivo como molde para la actividad primasa de *ccdc111*. En resumen, y al igual que la gran mayoría de las primasas, *ccdc111* requiere reconocer como molde una cadena de DNA que se encuentre abierta (como cadena sencilla).

Cuando el ensayo se llevó a cabo utilizando como nucleótido marcado $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, para tratar de favorecer la elongación de los iniciadores, se obtuvo un resultado similar a juzgar por la escalera de bandas de menor tamaño, que son las que se corresponden realmente con productos de iniciación ([Fig. 39C](#); carriles 2 y 9). Sin embargo, en la figura llama la atención la aparición de una banda fuertemente marcada, de un tamaño concreto en cada caso, y únicamente en los carriles 3, 5, 7 y 10. Esas posiciones marcadas se corresponden aproximadamente con la longitud total de los oligos poliA que hibridan con las colas de Ts de la región 5' de los oligos que contienen la secuencia de reconocimiento. Por tanto, *ccdc111* parece ser capaz de extender el extremo 3' de esos oligos aprovechando posibles estructuras tipo molde/iniciador que se estén formando en estos extremos, que permitirían incorporar el nucleótido marcado dATP (detectable por estar marcado en el fósforo

alfa). Este marcaje no puede ser explicado por marcaje 3'-terminal como el que haría una terminal transferasa, ya que no aparecen en los carriles que contienen solo los oligos poli-A de banda simple (carriles 2 y 9). De modo que estos experimentos nos indicaron la presencia de una actividad DNA polimerasa convencional en la fracción utilizada, que como veremos en el siguiente capítulo, es intrínseca a ccdc111.

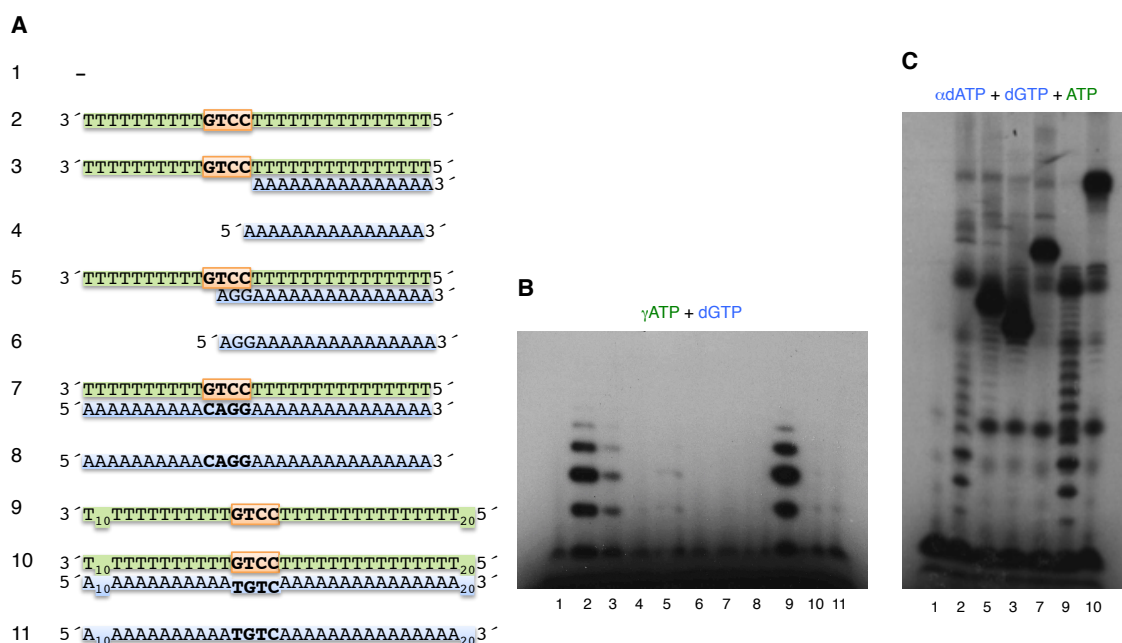


Figura 39. La actividad primasa de ccdc111 requiere un molde de cadena sencilla. A. Estructuras de los sustratos hibridados que ocultan en mayor o menor medida la secuencia 3'GTCC5'. **B.** Se evaluó la capacidad de iniciación de ccdc111 empleando [γ - 32 P]ATP (16 nM) y dGTP (10 μ M). **C.** Análisis de la posible capacidad de elongación de los iniciadores formados con [α - 32 P]dATP (16 nM), dGTP (1 μ M) y ATP (1,6 μ M).

3

***Actividad polimerasa de la PrimPol
humana***

3. Actividad polimerasa de la PrimPol humana

A diferencia de todas las primasas, las de arqueas son capaces de incorporar eficientemente dNTPs de forma consecutiva y pueden iniciar la síntesis del iniciador usando solo dNTPs, una reacción que las DNA polimerasas clásicas no pueden hacer (Le Breton et al. 2007). Es más, las primasas de arqueas son capaces de llevar a cabo la iniciación y extensión del iniciador hasta tamaños de 1 kb (RNA) y hasta 7 kb (DNA) (Lao-Sirieix & Bell 2004). Estas enzimas son tanto primasas como polimerasas y se han denominado PrimPols (Lipps et al. 2003). Nos planteamos evaluar si la proteína ccdc111 humana era capaz de extender un iniciador ya formado e hibridado a un molde de DNA en una reacción clásica de extensión como la que llevan a cabo las DNA polimerasas. La proteína ccdc111 humana fue capaz de extender un iniciador (17 nt) hibridado a M13cs utilizando dNTPs (Fig. 40), siendo de nuevo el manganeso el metal activador preferido. Se puede observar en la figura 40 que el mutante AxA carece de actividad DNA polimerasa, lo que demuestra no solo que la actividad es intrínseca a ccdc111 sino que la actividad DNA primasa y DNA polimerasa residen en el mismo centro activo. Por ello hemos propuesto el nombre de PrimPol, como acrónimo de sus actividades primasa y polimerasa, para la proteína humana ccdc111.

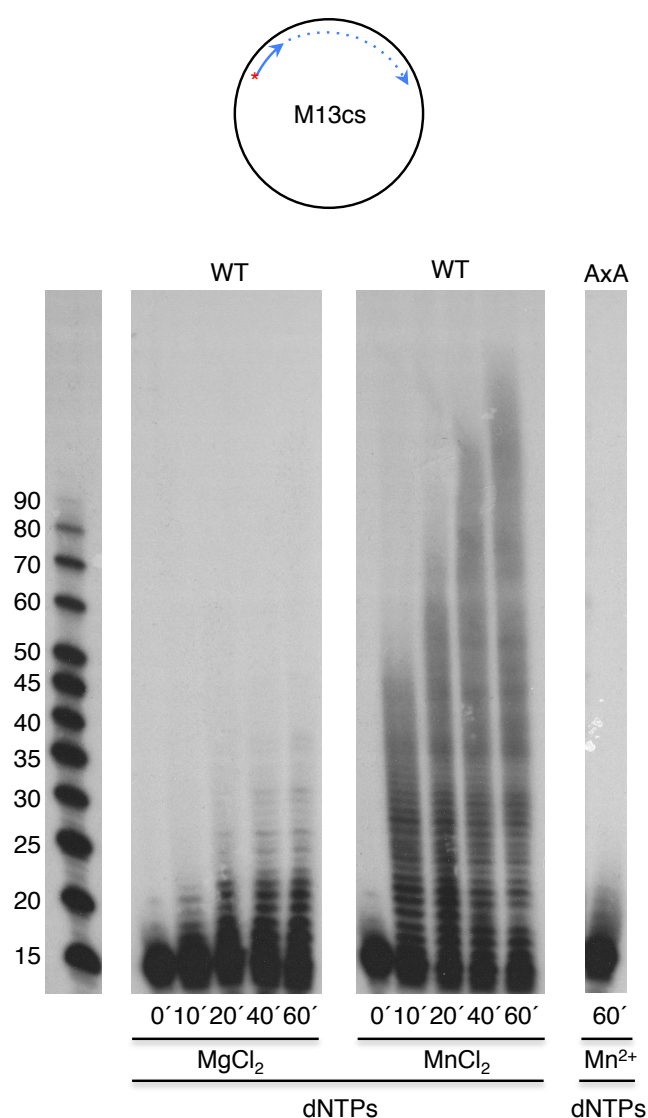


Figura 40. Actividad DNA polimerasa de PrimPol. Marcador de tamaño molecular en el panel izquierdo. Ensayo DNA polimerasa usando un iniciador hibridado a M13cs (1,5 nM), MgCl₂ (5 mM) o MnCl₂ (1 mM), dNTPs (1 μM) y PrimPol WT o AxA (400 nM).

3.1 PrimPol tiene actividad DNA polimerasa intrínseca

Con la finalidad de descartar que la actividad DNA polimerasa detectada pudiera deberse a posibles contaminantes de la purificación se llevaron a cabo dos estrategias. La proteína purificada fue sedimentada en un gradiente de glicerol (15-30 %) tal y como se indica en Materiales y Métodos. El fraccionamiento del gradiente permitió detectar actividad polimerasa coincidente con la masa de la proteína (analizada por electroforesis en gel desnaturalizante y tinción de Coomassie). Como se muestra en la [figura 41A](#), los dos perfiles (actividad y masa) son coincidentes, demostrando que la actividad polimerasa es intrínseca al monómero PrimPol, y que no existen otras actividades polimerasa de distinto peso molecular contaminando la fracción.

La otra estrategia se basó en la incubación, previa al ensayo, de PrimPol con anticuerpos policlonales (preparados según se describe en Materiales y Métodos). El secuestro de gran parte de la proteína por los anticuerpos impediría su unión al DNA, lo que nos permitiría determinar si PrimPol es la responsable o no de la actividad DNA polimerasa detectada. El ensayo de actividad polimerasa se llevó a cabo utilizando una estructura de DNA molde/iniciador y usando tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos, que son también sustratos válidos para la polimerización como se demostrará más adelante ([Fig. 41B](#)). En ambos casos se observó una clara disminución de los productos elongados cuando PrimPol había sido preincubada con los anticuerpos, lo que demuestra que la actividad de polimerización es intrínseca a PrimPol.

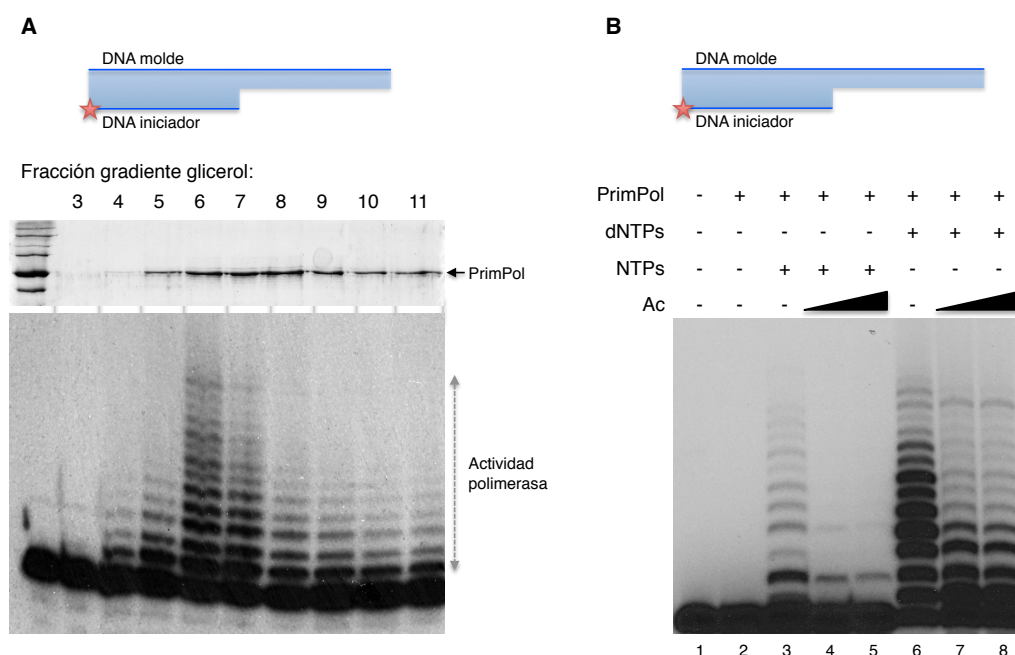


Figura 41. A. Gradiente de glicerol. Co-sedimentación de la actividad DNA polimerasa con la masa de la proteína PrimPol humana recombinante purificada. Se muestra el análisis por electroforesis en gel de poliácridamida y SDS y tinción de Coomassie de las fracciones señaladas. El panel inferior muestra un ensayo de DNA polimerasa usando un molde/iniciador y dNTPS (10 μ M). **B. Inhibición de la actividad polimerasa por anticuerpos específicos.** La fracción de PrimPol fue previamente incubada con o sin anticuerpos (1,83 y 7,32 mg/ml), y posteriormente se realizó un ensayo polimerasa sobre un molde/iniciador con NTPs (10 μ M) o dNTPs (10 μ M).

Además de los experimentos descritos, una prueba más contundente de que la actividad DNA polimerasa es intrínseca a PrimPol se obtuvo utilizando el mutante AxA, que había demostrado ser catalíticamente nulo para la actividad primasa del enzima ([Fig. 17](#)), y que lo fue también en el ensayo de actividad DNA polimerasa ([Fig. 40](#), carril derecho). La ausencia de ambas actividades, primasa y

polimerasa, en presencia del mutante AxA (que carece de dos presuntos residuos catalíticos) demuestra, no solo que las actividades son intrínsecas a PrimPol, sino que comparten sitio activo.

3.2 PrimPol sintetiza DNA de forma distributiva

Las DNA polimerasas tienen diferentes propiedades de polimerización como, por ejemplo, el número de nucleótidos que son capaces de insertar en cada evento de unión al sustrato de DNA, y que puede variar desde uno a más de 10 000. La procesividad, o capacidad de llevar a cabo un elevado número de ciclos de reacción sin disociarse del molde, es una característica de las DNA polimerasas replicativas, ya que necesitan estar capacitadas para realizar una síntesis muy extensiva (la copia del genoma) que se basa en una interacción muy estable del enzima con el DNA, así como en una elevada velocidad de reacción. Por el contrario, otras DNA polimerasas tienen una reducida afinidad por DNA y una menor velocidad de reacción, por lo que llevan a cabo una síntesis distributiva que supone frecuentes disociaciones del DNA.

En la [figura 42](#) se muestra el producto de una reacción de polimerización de PrimPol cuya longitud total alcanzada depende del tiempo de reacción. La profusión de las bandas intermedias sugiere que PrimPol lleva a cabo una síntesis muy distributiva, que provocaría que la polimerasa se disociase del sustrato de DNA después de cada evento de adición del nucleótido. Este comportamiento es compartido con otras DNA polimerasas implicadas en reparación y tolerancia al daño en el DNA. Para evaluar la procesividad de PrimPol, analizamos los cambios en el patrón de extensión cuando utilizamos concentraciones decrecientes de enzima. Si una DNA polimerasa es procesiva, los tamaños alcanzados no dependen de la cantidad relativa de enzima y moléculas de DNA; por el contrario una DNA polimerasa distributiva generará productos cuya extensión (tamaño) decrecerá de forma proporcional a la relación enzima/sustrato utilizada. Como se muestra en la [figura 42](#), la longitud de los productos sintetizados por PrimPol disminuye con la relación enzima/sustrato, de acuerdo con un patrón de polimerización distributivo.

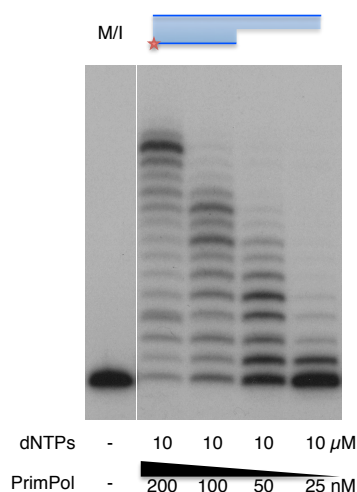


Figura 42. Distributividad de PrimPol. Síntesis de DNA realizada por PrimPol de forma distributiva, utilizando una concentración constante de dNTPs (10 μ M) y concentraciones decrecientes de proteína (200-25 nM). En la parte superior se muestra el esquema del molde/iniciador (M/I) utilizado, marcado en el extremo 5' de la cadena utilizada como iniciador.

3.3 Fidelidad de síntesis

La fidelidad con la que una DNA polimerasa es capaz de hacer una copia complementaria del DNA refleja directamente la naturaleza de las interacciones que se establecen entre la enzima y el DNA molde (Kunkel & Bebenek 2000). Estas interacciones son, a su vez, las que definen las características de los sustratos que la enzima es capaz de emplear. Las polimerasas de replicación son las que poseen la máxima fidelidad de inserción, que depende de la correcta selección del nucleótido frente a su molde complementario, y de su capacidad de edición de errores. Esta alta selectividad por los nucleótidos en el centro activo de las polimerasas replicativas se ve reflejada en

una baja tasa de error ($\approx 10^{-4}$ para Pol α a pesar de carecer de actividad correctora de errores). Las DNA polimerasas de reparación dependen únicamente de su fidelidad de inserción (no tienen actividad correctora de errores en la mayoría de los casos), que es moderada. La situación más extrema corresponde a las DNA polimerasas de translesión, encargadas de insertar nucleótidos frente a bases molde lesionadas, que no son fácilmente toleradas por la maquinaria replicativa; todas ellas carecen de actividad correctora de errores y tienen una muy baja selectividad del nucleótido debido a su especialización en aceptar moldes con lesiones, lo que conlleva una alta tasa de errores (Kunkel 2009).

Por tanto, nos planteamos llevar a cabo un análisis preliminar de la fidelidad de inserción de PrimPol, ya que además de permitir la obtención de una “huella” de polimerización de la enzima, nos podría dar un indicio sobre su posible función fisiológica.

Para evaluar la capacidad de PrimPol para discriminar entre los cuatro nucleótidos (discriminación de base) durante la polimerización, se utilizaron cuatro moléculas molde/iniciador donde solo cambia la primera base molde. Se evaluó la inserción de cada uno de los cuatro dNTPs en cada una de las cuatro estructuras molde/iniciador, cubriéndose los 16 pares de bases posibles (considerando correctos e incorrectos), en condiciones saturantes de enzima. PrimPol insertó preferentemente el nucleótido complementario a la primera base disponible en el molde (Fig. 43) mostrando una mayor eficiencia de reacción cuando se utilizó Mn^{2+} como metal activador, en lugar del Mg^{2+} utilizado de modo más convencional por la mayoría de DNA polimerasas. Esta mayor activación mediada por Mn^{2+} conlleva la incorporación errónea de nucleótidos con una mayor frecuencia (Fig. 43, panel izquierdo). Ha sido extensamente estudiado el papel del metal Mn^{2+} como potenciador de la actividad de las DNA polimerasas pero también es conocido que este promueve incorporaciones incorrectas (Beckman et al. 1985). En presencia de Mg^{2+} (Fig. 43, panel central y derecho), la incorporación de nucleótidos ocurre con mayor fidelidad (como se puede ver si aumentamos la exposición de este panel para poder compararlo con la reacción con Mn^{2+}), pero la baja actividad con este metal sugiere que no es utilizado por PrimPol para desempeñar su función.

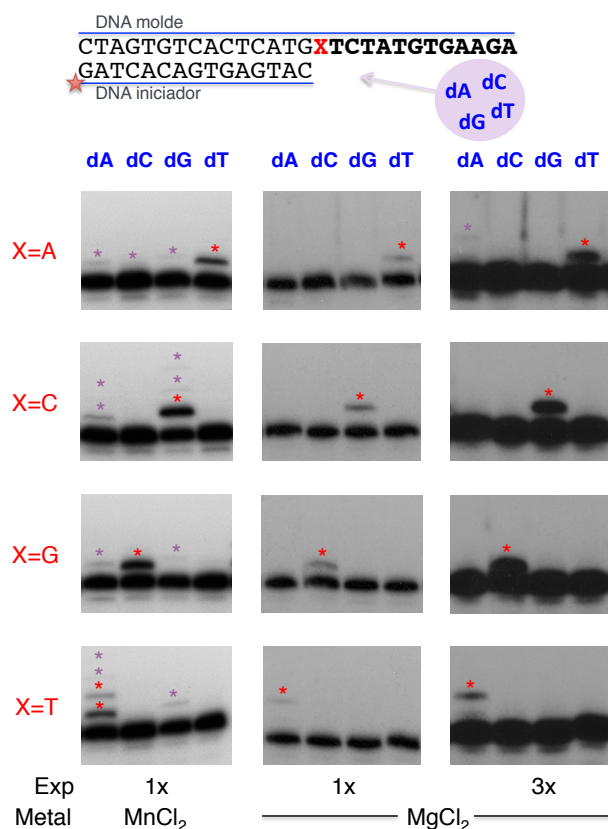


Figura 43. Fidelidad de inserción de nucleótidos por PrimPol. En la parte superior se muestra la estructura molde/iniciador utilizada, donde la X representa cada una de las cuatro posibles bases como molde. La inserción de cada dNTP (100 nM) se evaluó en presencia de $MnCl_2$ 1 mM o $MgCl_2$ 5 mM, (en este último caso se muestran dos exposiciones (1x y 3x). La inserción correcta (complementaria a la base molde) se indica mediante un asterisco rojo, mientras que las inserciones incorrectas se muestran con un asterisco morado.

Por tanto, teniendo en cuenta el nivel de inserciones incorrectas observado, se puede concluir que PrimPol no es una DNA polimerasa replicativa. PrimPol debe estar involucrada en algún tipo de síntesis donde no se requiera un alto nivel de fidelidad y por tanto en un tramo de síntesis corto con la finalidad de no dejar errores a su paso.

3.3.1 Uso de metales durante la polimerización

Se sabe desde hace décadas que las DNA polimerasas requieren la coordinación de cationes divalentes (dos iones metálicos) en su centro catalítico para su actividad nucleotidil-transferasa. Aunque se piensa que, debido a su abundancia en la célula, el Mg^{2+} es el cofactor activador fisiológico, se sabe que otros metales como el Mn^{2+} pueden sustituir al Mg^{2+} en ciertas condiciones *in vivo* (Beckman et al. 1985; Frank & Woodgate 2007).

En el capítulo 2, sobre la actividad primasa de PrimPol, ya se estudió cual era el metal favorito utilizado como cofactor y la concentración óptima de este. Para estudiar la preferencia en el uso de metales durante la actividad polimerasa se empleó una estructura de DNA tipo molde/iniciador y se cuantificó la adición de un dNTP a diferentes concentraciones de Mg^{2+} o de Mn^{2+} . La representación gráfica de estos resultados se muestra en la [figura 44](#), donde se observa de nuevo un óptimo a 1 mM de Mn^{2+} , siendo 3,5 veces mayor la actividad en esas condiciones que la mejor obtenida con Mg^{2+} (1 mM). Es interesante destacar también que la actividad observada a muy bajas concentraciones de Mn^{2+} , ya en el rango fisiológico, es superior a la que puede ser obtenida con Mg^{2+} . Por otra parte, concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} son inhibitorias. Todo ello sugiere que el metal activador utilizado *in vivo* por PrimPol podría ser el Mn^{2+} , como se ha descrito para otras DNA polimerasas (ver Discusión).

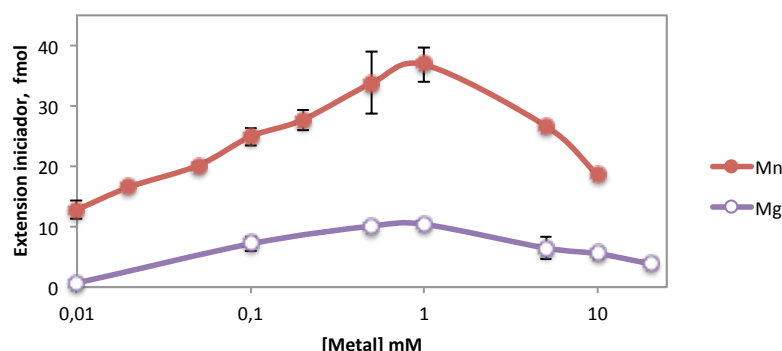


Figura 44. Óptimos de metal para la actividad DNA polimerasa de PrimPol. La gráfica presenta la cuantificación de la extensión del iniciador con un dNTP en un ensayo polimerasa usando un sustrato molde/iniciador y las concentraciones señaladas de $MnCl_2$ y $MgCl_2$.

3.4 PrimPol carece de actividad correctora de errores y extiende difícilmente extremos desapareados

Muchas DNA polimerasas tienen asociada una actividad 3'-5' exonucleasa que actúa en dirección opuesta a la polimerización con el fin de eliminar los errores introducidos y así disminuir su tasa de error (Kornberg & Baker 1992). Las polimerasas que tienen una actividad 3'-5' exonucleasa intrínseca o asociada poseen una fidelidad aumentada por poder escindir los nucleótidos incorrectamente insertados. En todas las DNA polimerasas dotadas con capacidad correctora de errores, el sitio activo de la actividad 3'-5' exonucleasa presenta tres motivos de estructura primaria denominados Exo I, Exo II y Exo III (Bernad et al. 1989). Estos motivos no están presentes en la secuencia de PrimPol, lo que sugiere que no posee de actividad 3'-5' exonucleasa.

Para abordar este asunto de modo directo, utilizamos un DNA molde/iniciador (Fig. 45) en el que el extremo del iniciador estaba o bien correctamente (panel izquierdo) o incorrectamente (panel derecho) apareado, y se proporcionaron cantidades crecientes de dATP (el nucleótido correcto a ser incorporado en la posición +1 del primer). La incubación de ambos DNAs con PrimPol en ausencia de dATP o con concentraciones muy bajas de este nucleótido, no produjo ninguna reducción del tamaño del iniciador (mas concretamente la eliminación del desapareamiento terminal), lo que indica que PrimPol no tiene actividad exonucleasa 3'-5'. Por otra parte, la dificultad para extender estos desapareamientos es un factor crítico que influye en la fidelidad de síntesis de una DNA polimerasa. En general, las DNA polimerasas tienen escasa capacidad de extender estos desapareamientos del iniciador. La extensión del iniciador desapareado llevada a cabo por PrimPol requirió una concentración de dATP aproximadamente 1000 veces superior a la necesaria en el caso del extremo apareado.

Sin embargo, cuando se evaluó la incorporación de un nucleótido incorrecto (dGTP) sobre esos dos DNAs, la eficiencia de inserción fue muy similar, y pareja a la inserción de dATP sobre el extremo desapareado. Esto sugiere que la extensión con dGTP realmente no ocurre sobre la base molde T, sino sobre la base anterior (C) que está apareada (o desapareada) al extremo del iniciador. Para ello, PrimPol debería ser capaz de inducir el desapareamiento del extremo también en el caso de la molécula que está correctamente apareada, dislocándolo para permitir la inserción de dGTP. En esas condiciones, la eficiencia de la reacción, si bien baja, no debería ser muy diferente entre ambas moléculas de DNA.

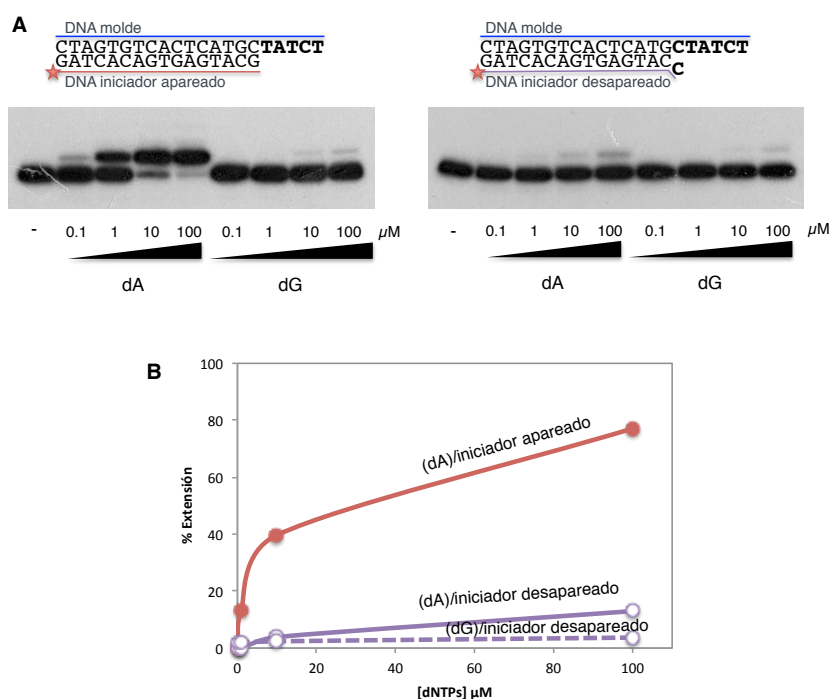


Figura 45. Extensión por PrimPol de un iniciador desapareado. **A.** Se realizó un ensayo polimerasa usando un molde/iniciador correctamente apareado (panel izquierdo) con la adición de dA (correcto) o dG (incorrecto), o con un molde/iniciador desapareado (panel derecho) con la adición de dA o dG. **B.** La representación gráfica muestra la cuantificación de la extensión de los iniciadores correcta o incorrectamente apareados.

3.5 Análisis de la afinidad de PrimPol por los dNTPs.

Para evaluar la capacidad de unión de PrimPol a los dNTPs se realizaron medidas cinéticas de polimerización en condiciones de estado estacionario sobre una estructura de DNA, midiendo la incorporación de un único nucleótido (ver Materiales y Métodos). Los valores obtenidos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y se emplearon para determinar los parámetros cinéticos de polimerización de PrimPol para cada dNTP (Tabla 6). Como otros enzimas, las DNA polimerasas pueden ser caracterizadas mediante la determinación de la concentración de sustrato (dNTPs) a la

cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Esta concentración de sustrato se conoce como constante de Michaelis-Menten (K_M), que expresa la afinidad que tiene la polimerasa por los nucleótidos. La K_M aparente para los dNTPs (alrededor de $3 \mu\text{M}$, como promedio) que caracteriza a PrimPol es relativamente baja, siendo intermedia entre la K_M de Pol β y Pol λ (García-Díaz et al. 2002). Este bajo valor de K_M quiere decir que PrimPol tiene una elevada afinidad por los dNTPs.

Por otra parte se ha calculado la k_{cat} que, expresada como el tiempo necesario para un ciclo de reacción, da una medida directa de la catálisis en condiciones óptimas de sustrato. Se puede decir que la k_{cat} mide el número de dNTPs convertidos en DNA por segundo. Por último, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) es una medida relativa de la importancia de los dos parámetros descritos anteriormente.

Sustrato	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	Eficiencia catalítica k_{cat}/K_M
dATP	3	0.06	0.02
dCTP	4	0.04	0.01
dGTP	2.5	0.05	0.02
dTTP	4	0.04	0.01

Tabla 6. Parámetros cinéticos de PrimPol. Se indican las constantes K_M y k_{cat} y la eficiencia catalítica de la enzima para la inserción de cada dNTP en una estructura molde/iniciador.

3.6 Discriminación del 3'OH del nucleótido

Para analizar si PrimPol discrimina entre la presencia o ausencia de un grupo OH en la posición 3' de la desoxirribosa del nucleótido entrante, se evaluó la inserción de un didesoxinucleótido (ddNTP). Los didesoxinucleótidos son terminadores de cadena, ya que la ausencia del grupo hidroxilo en posición 3' implica que después de su inserción, la DNA polimerasa no puedan llevar a cabo sucesivas adiciones de nucleótidos ya que el 3'-OH es esencial para el ataque nucleofílico y por tanto para la formación del siguiente enlace fosfodiéster.

Se llevó a cabo un ensayo de DNA polimerasa usando un molde/iniciador que posee dC en la primera posición de copia, y se comparó la incorporación de dGTP respecto a la de ddGTP. Como se muestra en la [figura 46](#), PrimPol no incorporó ddGTP (carril 4), ni la incorporación de dGTP (carril 3) fue inhibida por la presencia simultánea de concentraciones hasta 100 veces superiores de ddGTP (carriles 5-7).

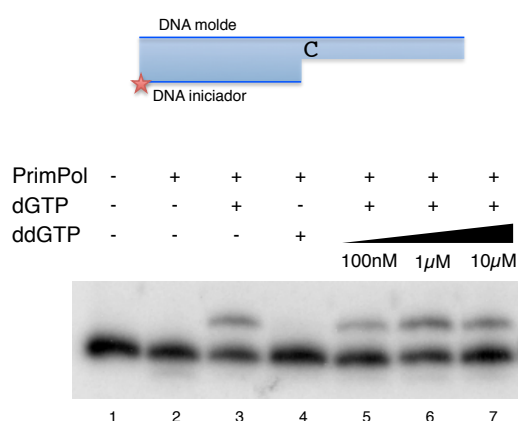


Figura 46. Uso de ddNTPs. Ensayo polimerasa sobre un molde/iniciador usando dGTP (100 nM), ddGTP (100 nM) o dGTP (100 nM) con concentraciones crecientes de ddGTP.

Para estudiar si PrimPol posee capacidad de desplazamiento de cadena se diseñó una estructura

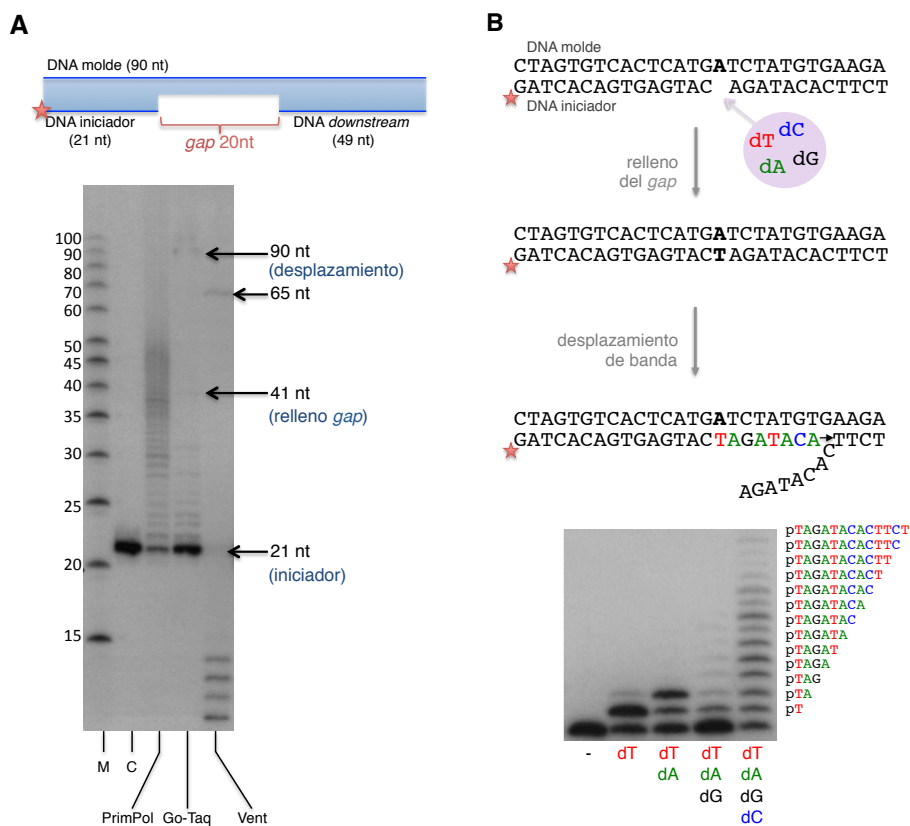


Figura 47. Actividad de desplazamiento de cadena. **A.** Polimerización y desplazamiento de cadena sobre un sustrato GAP20, por las enzimas PrimPol, y Vent o Go-Taq como controles positivo y negativo, respectivamente; M marcador, C control sin enzima. **B.** Polimerización y desplazamiento de la hebra *downstream* a medida que se aportan los dNTPs (10 μ M) necesarios, en el correcto orden secuencial.

Por último, se quiso comprobar que el desplazamiento de cadena podía ocurrir a partir de un gap de un único nucleótido, y que la extensión obtenida no se debía a síntesis recurrente dirigida por el molde del gap, sino que dependía de la dirección de la cadena molde que estaba siendo accesible, vía desplazamiento de la cadena complementaria. Para ello se ensayó a PrimPol en un *gap* de uno y se le proporcionaron los nucleótidos en el orden necesario para copiar correctamente el molde (Fig. 47B). Como esperábamos, PrimPol fue capaz de producir la extensión del iniciador (mas allá de producto +1 correspondiente al relleno del gap) generando productos cuyo tamaño es compatible con la dirección de molde (disponible una vez abierto) y el grupo de dNTPs proporcionados en cada caso. Esta capacidad de desplazamiento de banda intrínseca a PrimPol sugiere que podría estar involucrada en el proceso de reparación por escisión de base (BER) de trecho largo.

3.8 PrimPol tiene actividad DNA y RNA polimerasa intrínseca

Teniendo en cuenta la capacidad de PrimPol para usar, aunque no con la misma eficiencia, ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos para su actividad primasa, se estudió la capacidad de PrimPol de aceptar ambos azúcares como sustrato tanto en los iniciadores como en los nucleótidos libres usados para elongarlos. De modo que se utilizaron estructuras de tipo molde/iniciador donde el iniciador puede ser DNA o RNA y se proporcionaron ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos para extenderlos (Fig. 48). PrimPol extiende el iniciador de DNA con dNTPs 100 veces mejor que con NTPs (paneles superiores), por otro lado y de forma similar el iniciador de RNA se extiende 100 veces mejor con dNTPs que con NTPs (paneles inferiores). Esta discriminación no parece tan importante con respecto a la naturaleza del iniciador, ya que aunque extiende mejor un iniciador de DNA, la diferencia es solo de unas 10 veces con respecto a la extensión de uno de RNA, ambos con dNTPs (paneles izquierdos). Esta capacidad residual, pero significativa, de incorporación de ribonucleótidos queda avalada por el mutante AxA, que fue llevado en paralelo en estos ensayos para demostrar que las actividades observadas son intrínsecas a la proteína. Por tanto, se podría decir que PrimPol tiene actividades DNA polimerasa y RNA polimerasa.

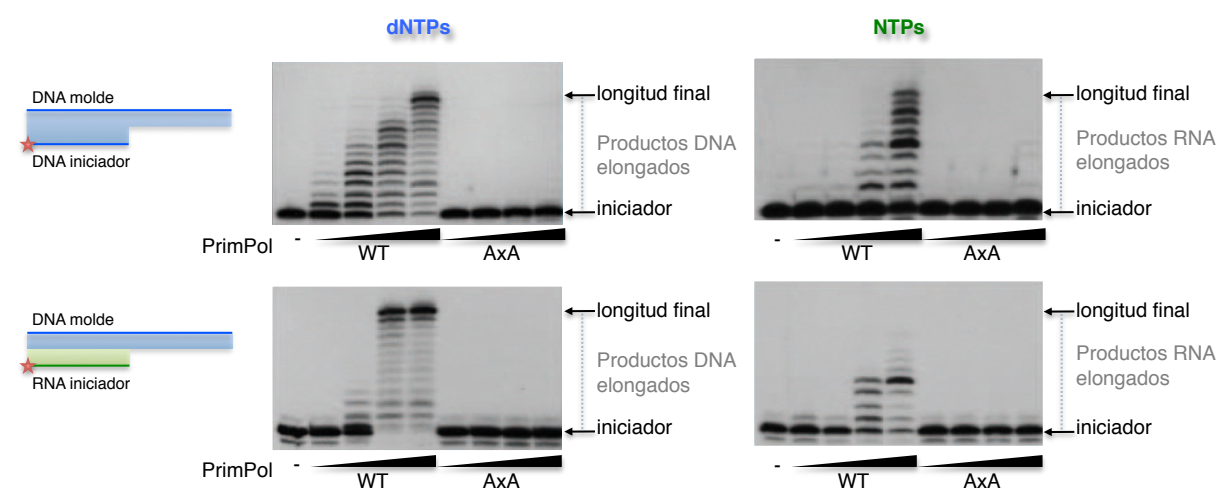


Figura 48. Discriminación del azúcar en el iniciador o los nucleótidos. Actividad polimerasa de PrimPol WT o AxA (25-200 nM) sobre un sustrato de molde/iniciador DNA/DNA (paneles superiores) extendido con dNTPs o NTPs (10 μ M). Actividad polimerasa sobre un sustrato de molde/iniciador DNA/RNA (paneles inferiores) extendido con dNTPs o NTPs (10 μ M).

3.9 Actividad retrotranscriptasa de PrimPol

Tal y como se acaba de mostrar, PrimPol es capaz de aceptar ambos azúcares utilizando iniciadores de DNA o RNA, con eficiencia muy similar, en un estructura tipo molde/iniciador durante la polimerización. Dado su versatilidad, PrimPol fue ensayada copiando un molde de RNA en lugar del molde de DNA, proceso denominado retrotranscripción. Este proceso es llevado a cabo por una DNA polimerasa que transcribe una cadena de RNA a DNA. En la [figura 49](#) se compara la capacidad de PrimPol de copiar un molde convencional de DNA, frente a copiar un molde, equivalente en secuencia, de RNA. Aunque la eficiencia de la enzima en este tipo de reacción es menor se puede observar que la síntesis sigue un patrón de lectura fiel del molde. Aunque no se puede implicar a PrimPol en un proceso estricto de retrotranscripción ya que este se da solo en algunos virus, sí se ha descrito que existen algunos ribonucleótidos incorporados por incluso las DNA polimerasas de forma esporádica en el DNA (McElhinny et al. 2010). Según la actividad retrotranscriptasa observada en PrimPol se puede deducir que no va a suponer ningún problema para esta proteína polimerizar a través de un molde que contenga alguna carga de NTPs insertados.

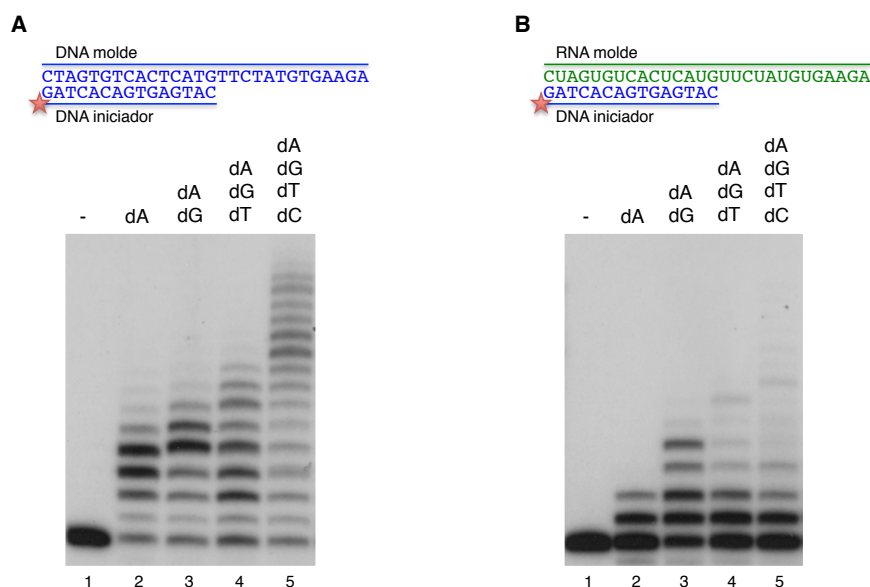


Figura 49. Actividad retrotranscriptasa de PrimPol. **A.** Ensayo polimerasa sobre una estructura molde/iniciador tipo DNA/DNA usando los dNTPs (10 μ M) en orden según requerimiento de secuencia. **B.** Ensayo retrotranscriptasa usando un sustrato molde/iniciador tipo RNA/DNA usando distintas combinaciones de dNTPs (10 μ M) añadidos en el orden dictado por el requerimiento de secuencia.

3.10 Actividad sobre sustratos de reparación

Las DNA polimerasas de reparación son capaces de actuar en un hueco del DNA que puede quedar como consecuencia de la acción de la maquinaria de reparación de escisión de base (BER) o de nucleótido (NER). Se sabe que las DNA polimerasas de la familia X (Pol β y Pol λ) implicadas en reparación incrementan su procesividad al llevar a cabo la síntesis en una estructura de DNA de tipo *gap* (Sawaya et al. 1997; García-Díaz et al. 2002). Este efecto depende de la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' de la molécula *downstream* del *gap*. Esta capacidad es congruente con el papel en reparación de estas polimerasas ya que están implicadas en procesos donde es necesaria una síntesis de pocos nucleótidos en un hueco del DNA.

Para evaluar si las propiedades de polimerización de PrimPol pudieran ser compatibles con una posible función en reparación de DNA, se decidió evaluar la polimerización que PrimPol realizaría en *gap* con o sin grupo fosfato, en comparación con una molécula equivalente de molde/iniciador abierta. Como se muestra en la [figura 50](#), la actividad polimerasa de PrimPol no se vio favorecida (ni

condicionada) por la presencia de un *gap* en el DNA, independientemente de la presencia de un grupo 5'P. Además PrimPol no se detiene al completar el relleno del *gap*: si bien se observa una parada cuando PrimPol termina de rellenar el *gap*, la elongación prosigue posteriormente, mediante el desplazamiento de la cadena de DNA *downstream*. Este comportamiento parece descartar la posible función de PrimPol en procesos de BER o NER.

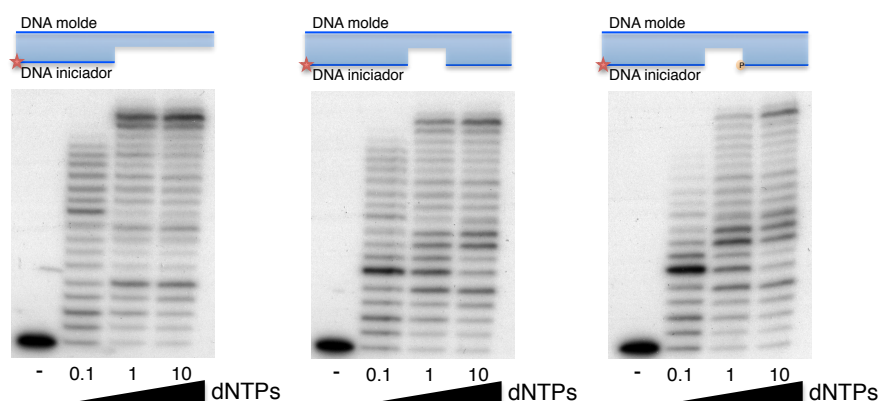


Figura 50. Actividad DNA polimerasa de PrimPol en una estructura tipo *gap*. Polimerización por PrimPol sobre sustratos tipo molde/iniciador, *GAP*5'OH o *GAP*5'P utilizando las concentraciones de dNTPs indicadas.

3.10.1 PrimPol carece de actividad dRP-liasa

Una propiedad típica de las polimerasas involucradas en BER de único nucleótido es poseer actividad dRP-liasa, capaz de eliminar los grupos 5'-desoxirribosa-5-fosfato (dRP) del extremo 5' de la cadena *downstream*. Para investigar la posible presencia de dicha actividad en PrimPol se llevó a cabo un ensayo dRP-liasa, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Para ello, la cadena que contiene el uracilo se marcó radiativamente en su extremo 3'. Posteriormente se trató con uracil DNA-glicosilasa humana (hUDG) para eliminar la base del uracilo, y con AP endonucleasa humana (hAPE) para generar el sustrato con el residuo dRP. Este sustrato se incubó con Polλ humana (como control positivo), o con cantidades crecientes de PrimPol. La [figura 51](#) muestra que solo Polλ fue capaz de llevar a cabo la eliminación del residuo dRP, por lo que concluimos que PrimPol carece de actividad dRP-liasa detectable quedando descartado su papel en el proceso de BER de trecho corto.

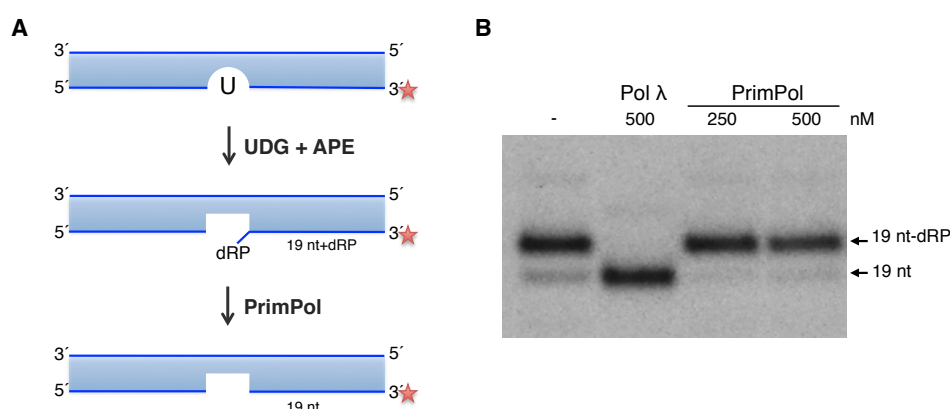


Figura 51. Ausencia de actividad dRP-liasa en PrimPol. Representación esquemática del ensayo dRP-liasa. El esquema muestra un DNA doble cadena que contiene un uracilo en la posición 16 de la cadena marcada en el extremo 3'. Después del tratamiento con UDG y APE, se obtiene un sustrato con un corte que contiene un residuo dRP (19 nt+dRP). El análisis desnaturalizante efectuado tras la reacción demuestra el cambio de movilidad correspondiente a la conversión del sustrato 19 t+dRP en el producto de 19 nt, únicamente en el caso de Polλ (control positivo) pero no por parte de PrimPol.

4

***Estudio del centro activo de
PrimPol***

4.1 Predicción de residuos implicados en la catálisis

Con la finalidad de identificar y definir los posibles residuos responsables de la catálisis se realizó un estudio mediante alineamientos de secuencias de las proteínas CCDC111 homólogas a la humana. De este modo se identificaron hasta 14 motivos muy conservados dentro de esta nueva familia de PrimPol. Entre ellos cabe destacar los denominados motivos A, B y C (Fig. 52) que contienen los posibles residuos catalíticos, probablemente implicados en la coordinación del metal y la interacción con el nucleótido entrante. En la PrimPol humana, objeto de esta tesis, estos residuos son concretamente: Asp¹¹⁴ y Glu¹¹⁶ en el motivo A, His¹⁶⁹ en el B y Asp²⁸⁰ en el motivo C. Estos motivos están conservados en toda la superfamilia de primasas tipo AEP incluyendo las PrimPols conocidas hasta ahora. Se ha demostrado mediante mutagénesis dirigida, en algunas AEPs previamente caracterizadas, que estos residuos son esenciales para la catálisis (Lipps et al. 2004; Lao-Sirieix & Bell 2004).

Como ya se ha descrito anteriormente, el motivo DxD de unión a metal que de forma general se encuentra en el sitio activo de diferentes primasas y polimerasas es sustituido por DxE en CCDC111/PrimPol. Se ha demostrado el papel crucial de este motivo con el mutante AxA de la PrimPol humana, catalíticamente nulo, donde la sustitución simultánea del Asp¹¹⁴ y el Glu¹¹⁶ por Ala conlleva una pérdida total de las actividades descritas para PrimPol.

Para tratar de entender mejor la selección evolutiva del cambio del segundo aspártico por un glutámico se diseñaron varias proteínas mutadas donde se sustituyen los Asp por Glu y viceversa. De este modo, ya que ambos son residuos con carga negativa, se valorará la importancia de uno u otro y la posición de los mismos en los tres posibles sitios: 114, 116 y 280.

Además del motivo DxE (o DxD en general) y del tercer aspártico conservado, en todas las AEPs se conserva de forma específica una histidina (dentro del motivo sxH) localizada en una lámina β situada en una posición central del dominio tipo RRM (Motivo de Reconocimiento de RNA) (Iyer et al. 2005). Como se puede observar en la figura 52, la His¹⁶⁹ está conservada en todos los homólogos de esta nueva familia PrimPol. Se decidió realizar el cambio de esta His¹⁶⁹ por Ala para evaluar si este residuo es también esencial en la catálisis. Además, se evaluó el cambio más conservativo a Tyr, ya que ambos aminoácidos tienen un anillo aromático en su cadena lateral, ocupan un espacio similar y por tanto la función de la His podría ser sustituida por la Tyr.

PrimPol

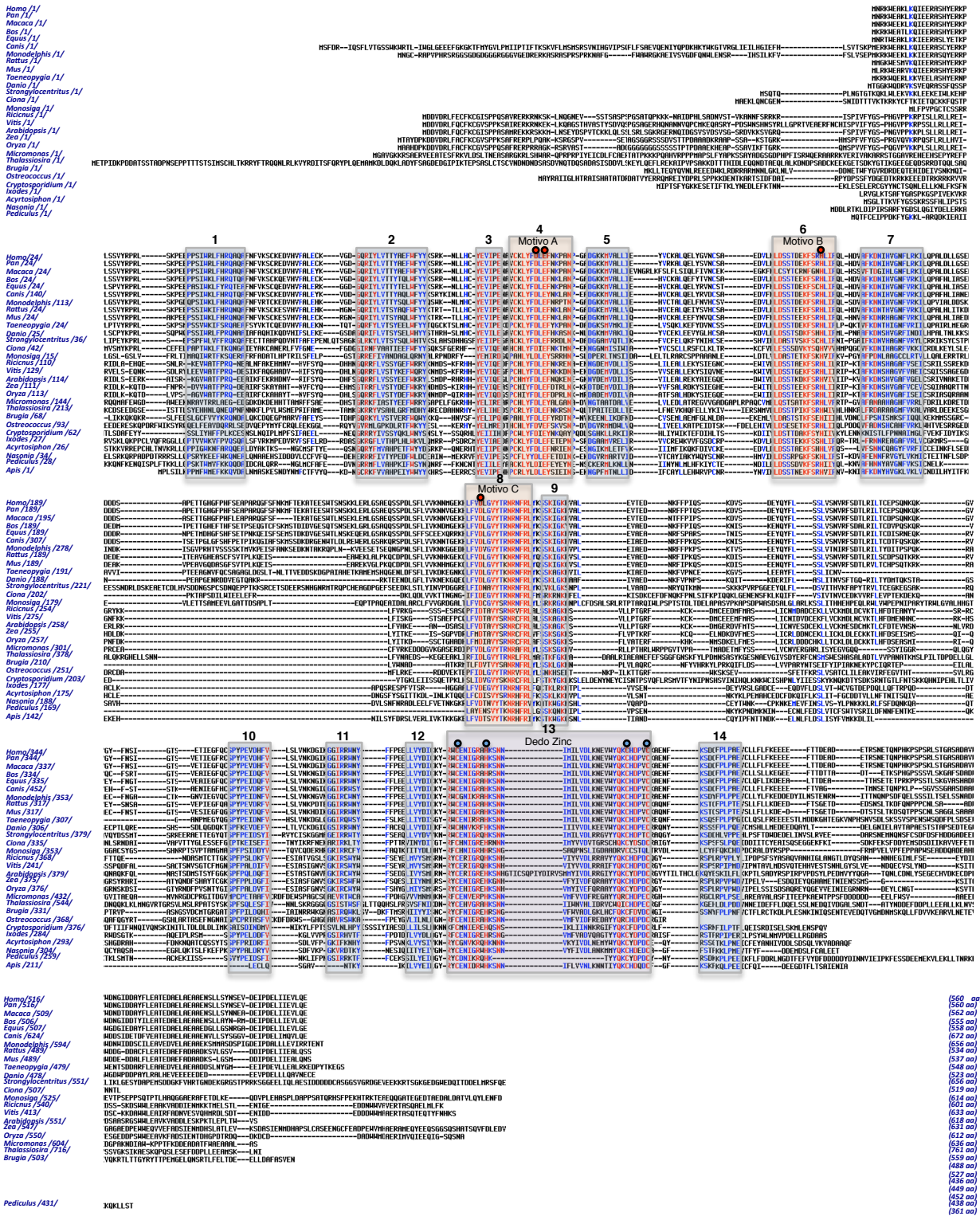


Figura 52. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas homólogas a la ccdc111 humana. Los números entre barras indican la posición del aminoácido relativa al N-terminal, y los números entre paréntesis indican el número total de aminoácidos. Se indican residuos invariantes o altamente conservados (rojos) y otros conservados en la mayoría de las secuencias (azul). El alineamiento define 14 regiones conservadas (cajas) a lo largo de la familia ccdc111, incluyendo los motivos altamente conservados A, B y C, característicos de las primasas AEP, y el motivo dedo de zinc, característico de algunas primasas. Los puntos sobre las secuencias indican residuos invariantes que actúan uniendo metal y nucleótido (rojo) o coordinando zinc (azul). Los alineamientos múltiples de los diferentes miembros de la familia ccdc111 (PrimPol) en eucariotas ha sido realizado usando el programa MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>).

4.2 Demostración de la importancia funcional de los residuos identificados

Para comprobar que los residuos identificados son en efecto responsables de la catálisis se diseñaron mutantes de la proteína en cada uno de estos residuos, que fueron sustituidos por alanina. El cambio de aminoácidos con carga negativa (Asp y Glu) o positiva (His) a un aminoácido más sencillo como la Ala, de pequeño tamaño y sin carga, debe producir un cambio drástico en la actividad si el residuo en cuestión está realizando una función esencial en el centro activo de la proteína, poniendo de manifiesto la existencia de interacciones a través de sus cadenas laterales. Los mutantes fueron diseñados tal y como se detalla en Materiales y Métodos y la purificación siguió el mismo protocolo que el de la versión WT de PrimPol sin ninguna particularidad a destacar. Se diseñó además de la mutación AxA, el triple mutante (3A) en el que los aminoácidos Asp¹¹⁴, Glu¹¹⁶ y Asp²⁸⁰ fueron sustituidos de manera simultánea por Ala. De igual modo se realizaron las mutaciones individuales: D114A, E116A, D280A y H169A. Se evaluaron las actividades primasa y polimerasa de estas proteínas mutadas, resultando todas las mutaciones perjudiciales para su actividad (Tabla 7). En resumen, la eliminación, mediada por la sustitución a alanina, de cada uno o de varios de estos residuos llevó a la pérdida total de las actividades de PrimPol. Esto pone de manifiesto que los aminoácidos identificados configuran el centro de la activo de la enzima, siendo probablemente los responsables de la unión al metal y al nucleótido entrante, además de establecer posibles interacciones con el DNA molde. El hecho de que estas mutaciones eliminen tanto la actividad primasa como la polimerasa demuestra que ambas actividades residen en el mismo centro catalítico de la proteína, ya que son los mismos residuos los responsables de una y otra función.

Proteína/Actividad	Primasa	Polimerasa
WT	100 %	100 %
3A	0 %	0,6 %
AxA	0 %	4,5 %
D114A	0,1 %	5,5 %
D114E	0,2 %	8,8 %
E116A	0,1 %	3,6 %
E116D	87,4 %	100 %
D280A	0,1 %	6,7 %
D280E	77,2 %	65 %
H169A	0,2 %	2,7 %
H169Y	0,1 %	3,1 %

Tabla 7. Cuantificación de la actividad primasa y polimerasa de las proteínas mutadas en el centro activo. La actividad primasa fue ensayada sobre el molde Gtcc y la combinación de nucleótidos [γ -³²P] ATP (16 nM) y dGTP (10 μ M) y la actividad polimerasa fue ensayada sobre una estructura del tipo molde/iniciador con concentraciones crecientes de dNTPs (1, 10 y 100 μ M).

Con el fin de estudiar la importancia de que los residuos ácidos de los motivos A y C sean Asp o Glu se realizaron las sustituciones de Asp a Glu y viceversa, obteniendo la colección de proteínas mutadas: D114E, E116D y D280E, como se describe a continuación.

4.2.1 Motivo A, Asp¹¹⁴ y Glu¹¹⁶

Se procedió a realizar las sustituciones D114E y E116D. La mutación D114E deja el sitio activo de la proteína con un motivo ExE (no encontrada de forma natural) pero la mutación E116D genera un motivo DxD que es el que se encuentra en la mayoría de las proteínas que sintetizan ácidos nucleicos. Se ensayó la actividad primasa y polimerasa de ambos mutantes (Tabla 7), y se concluyó que únicamente la mutación E116D mantiene ambas actividades.

Se decidió estudiar en mayor profundidad esta versión mutada de la proteína que contiene el motivo DxD en lugar del DxE e intentar averiguar si la existencia de un Glu¹¹⁶ confiere a la proteína

alguna de sus peculiaridades, que podrían estar mermadas en el mutante E116D. Con respecto a la actividad primasa se realizaron ensayos en paralelo con la proteína WT y el mutante E166D, tanto en el molde M13cs utilizando NTPs y dNTPs (Fig. 53A), como en el molde Gtcc (Fig. 53B): los iniciadores sintetizados por la proteína WT y el mutante E116D fueron similares en ambos ensayos primasa. Además, se llevó a cabo un ensayo primasa sobre el oligo Gtcc bajando la concentración de dGTP, evaluando así las proteínas en condiciones limitantes de sustrato (Fig. 53C), lo que permitiría apreciar diferencias menores en su actividad catalítica. La conclusión obtenida es que no se observa ningún cambio de las características como primasa por el hecho de presentar el motivo Dx D en lugar de su motivo natural Dx E. Se especuló que quizá este cambio en el centro activo podría permitir la catálisis en un rango de pH diferente. La versión WT de PrimPol es una proteína bastante ácida ya que su *pI* teórico es de 5.2, por lo que se ensayó la actividad primasa de la PrimPol WT y el mutante E116D en una franja de pH entre 5 y 8, dando resultados muy similares (datos no mostrados).

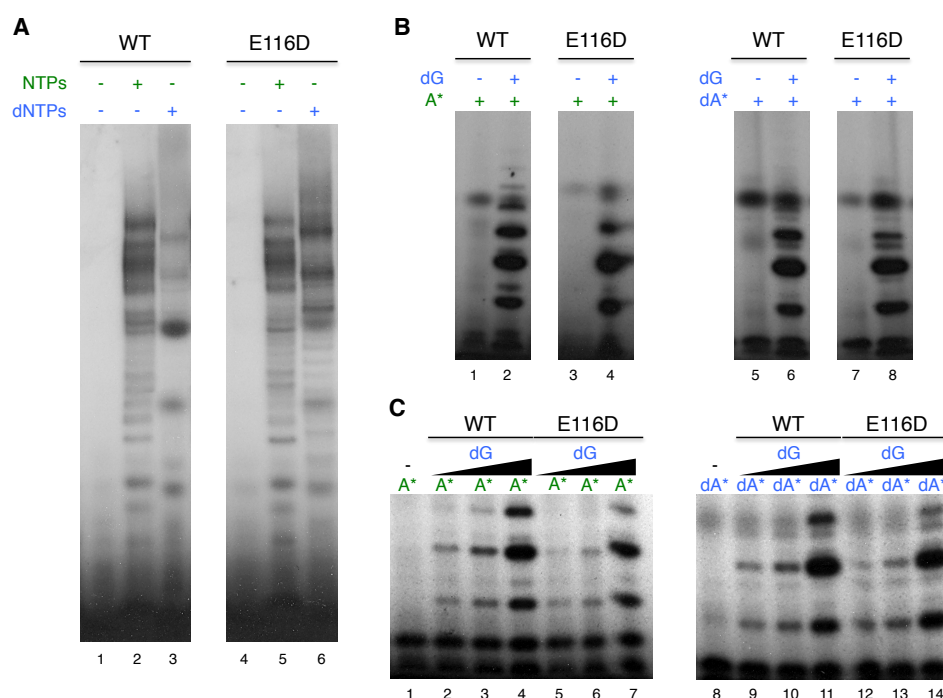


Figura 53. Evaluación de la actividad primasa de la versión mutada E116D de PrimPol. **A.** Ensayo de la actividad primasa sobre el molde M13cs de la versión WT (400 nM) frente al mutante E116D (400 nM) utilizando NTPs [ATP, GTP, UTP (100 μ M) y [α - 32 P]CTP (16 nM)] o dNTPs [dATP, dGTP, TTP (100 μ M) y [α - 32 P]dCTP (16 nM)]. **B.** Actividad primasa sobre el molde Gtcc, comparando la PrimPol WT frente al mutante E116D (400 nM), y empleando [α - 32 P]ATP (16 nM) + dGTP (10 μ M) o [α - 32 P]dATP (16 nM) + dGTP (10 μ M). **C.** Ensayo primasa sobre molde Gtcc similar al descrito en el apartado B, pero con concentraciones crecientes de dGTP (0.1, 1 y 10 μ M).

Para evaluar con mayor detalle la actividad polimerasa se realizó un estudio de la fidelidad de inserción de nucleótidos del mutante E116D en comparación con PrimPol WT (Fig. 54). La versión E116D de PrimPol no solo presentó una actividad polimerasa similar, sino que su preferencia por insertar el nucleótido correcto frente al molde fue la misma.

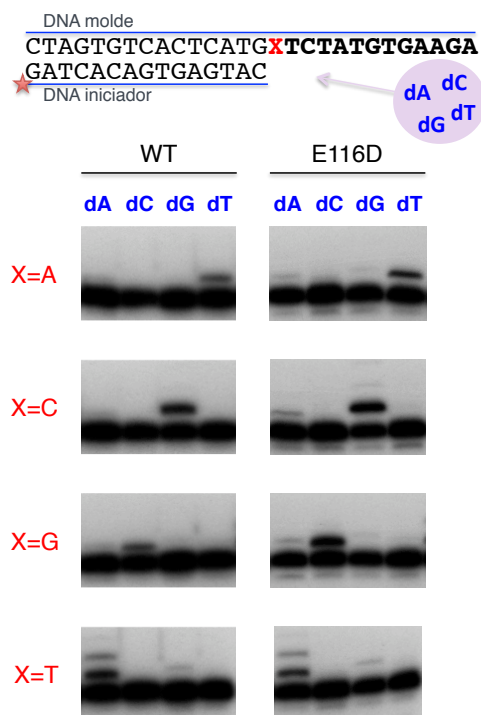


Figura 54. Fidelidad de polimerización de la proteína mutada E116D frente a la versión WT. En la parte superior se muestra el esquema de las 4 estructuras molde/iniciador utilizadas, donde la X es cada uno de los cuatro posibles desoxirribonucleótidos. Se evaluó la inserción de cada dNTP (100 nM) en presencia de MnCl_2 1 mM mediada por PrimPol WT (200 nM) o por el mutante E116D (200 nM).

4.2.2 Motivo C, Asp²⁸⁰

El cambio del Asp²⁸⁰ de PrimPol por un residuo Glu dio lugar a una proteína estable y activa. Por una parte la proteína mutada D280E mantuvo la actividad primasa sobre el molde Gtcc como se observa en la [figura 55A](#) aunque se detectó una actividad polimerasa menor ([Fig. 55B](#)). La sustitución del aminoácido Asp por Glu es un cambio conservativo ya que ambos tienen carga negativa, de modo que la presencia de Glu en la posición 280 ha conseguido mantener, en parte, la eficiencia de catálisis de ambas actividades de PrimPol.

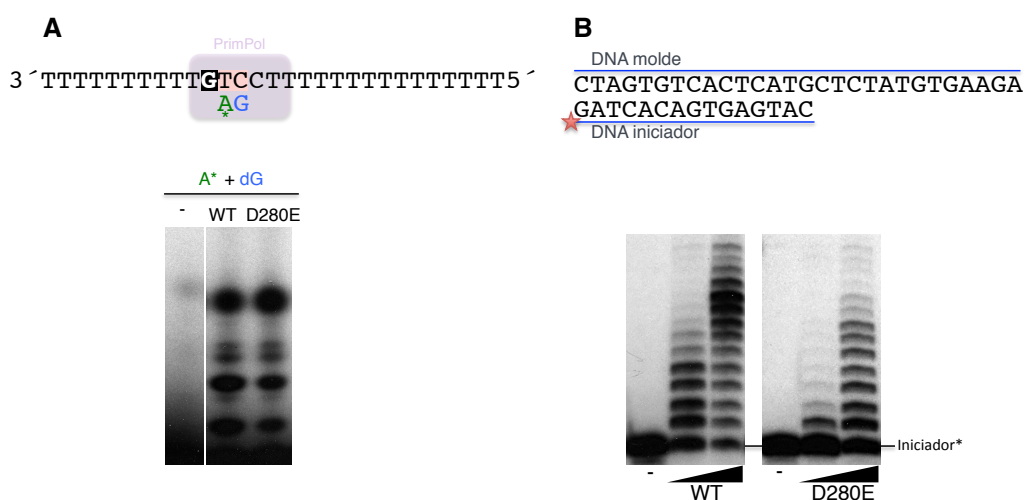


Figura 55. Evaluación de las actividades primasa y polimerasa de la versión mutada de PrimPol D280E. **A.** Actividad primasa de PrimPol WT (400 nM) frente al mutante D280E (400 nM) sobre el molde Gtcc, empleando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dGTP (10 μM). **B.** Ensayo DNA polimerasa sobre una estructura molde/iniciador utilizando dNTPs (10 μM) y PrimPol WT (200 y 400 nM) o el mutante D280E (200 y 400 nM).

La investigación de la importancia de la naturaleza de los residuos ácidos del centro activo de PrimPol sean Asp o Glu permite concluir que el único de los tres carboxilatos que ha de ser

indefectiblemente un residuo de aspártico es el primer residuo del motivo “DxE”, que en la PrimPol humana corresponde al Asp¹¹⁴.

4.2.3 Motivo B, His¹⁶⁹

Se evaluó la importancia e implicación en el centro activo de PrimPol humana del residuo His¹⁶⁹, una histidina invariante en todos los miembros de la familia de AEPs. Como se observa en la [figura 56](#) las sustituciones de este residuo a Ala o Tyr llevaron a una desaparición de la actividad primasa y polimerasa de PrimPol. Por tanto, el hecho de que la sustitución de esa histidina por tirosina no suponga un cambio conservativo es congruente con su presencia invariante en las AEPs, y apoya la relevancia de la carga positiva de la histidina, así como su naturaleza aromática, y de que este residuo tiene un papel funcional y no meramente estructural.

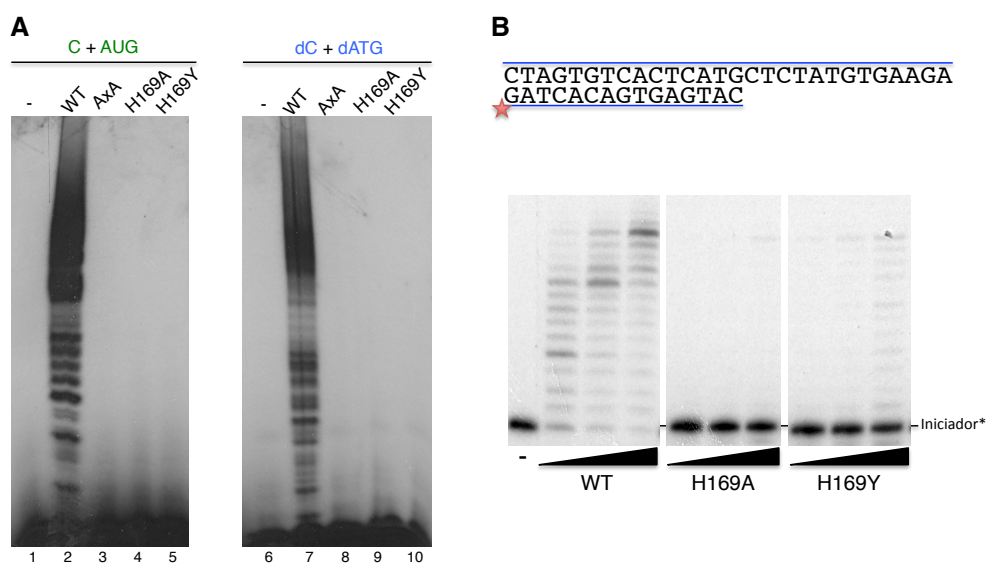


Figura 56. Evaluación de las actividades primasa y polimerasa de los mutantes H169A y H169Y frente a PrimPol WT. **A.** Actividad primasa sobre el molde M13cs empleando NTPs [ATP, GTP, UTP (100 μ M) y [α -³²P]CTP (16 nM)] o dNTPs [dATP, dGTP, TTP (100 μ M) y [α -³²P]dCTP (16 nM)] de PrimPol WT, y de los mutantes AxA, H169A y H169Y (400 nM). **B.** Actividad DNA polimerasa sobre un molde/iniciador en presencia de dNTPs (10 μ M) y PrimPol WT, o los mutantes H169A y H169Y (200, 400 y 600 nM).

En la [figura 57A](#) se puede observar la conservación de determinados residuos críticos en la estructura y función de proteínas de la superfamilia AEP que han sido previamente caracterizadas.

La PrimPol humana no solo tiene funciones comunes (primasa y polimerasa) con la PrimPol del plásmido pRN1 de la arquea *S. islandicus* sino que además comparte residuos o dominios exclusivos para ambas proteínas. Entre estos cabe destacar el motivo DxE y el dominio dedo de zinc, del que se hablará más adelante.

En la [figura 57B](#) se muestra la estructura de los centros catalíticos de tres ejemplos de AEPs: una AEP tipo PrimPol (ORF 904 del plásmido pRN1 de *S. islandicus*), el PolDom de una AEP tipo LigD (*Mycobacterium tuberculosis*) y la subunidad pequeña de una primasa clásica, PriS, (*Pyrococcus horikoshii*). En las tres estructuras se puede observar los residuos del motivo DxD (o DxE), la His y el tercer Asp. Los tres aspárticos (en rojo) coordinan los metales necesarios para la catálisis, y la histidina (en verde) del motivo +GhH (+ es un residuo cargado positivamente y h, un residuo hidrofóbico) localizada en su proximidad. Aunque esta histidina está conservada en los tres tipos de AEP su función parece ser diferente. En el caso de PriS la histidina está ayudando a configurar el centro activo, y según se ha observado en las estructuras disponibles, esta histidina puede

interaccionar con los aspárticos y con el metal. Pero además de esta histidina, PriS posee otra histidina, no conservada en las LigD ni PrimPol, que interacciona con el nucleótido entrante como puede verse en la estructura. Tanto PrimPol como LigD carecen de esa segunda histidina y es la primera histidina la que podría realizar ambas funciones. Parece que estas AEPs son versiones más sencillas, o quizás menos evolucionadas, de la superfamilia de las AEPs.

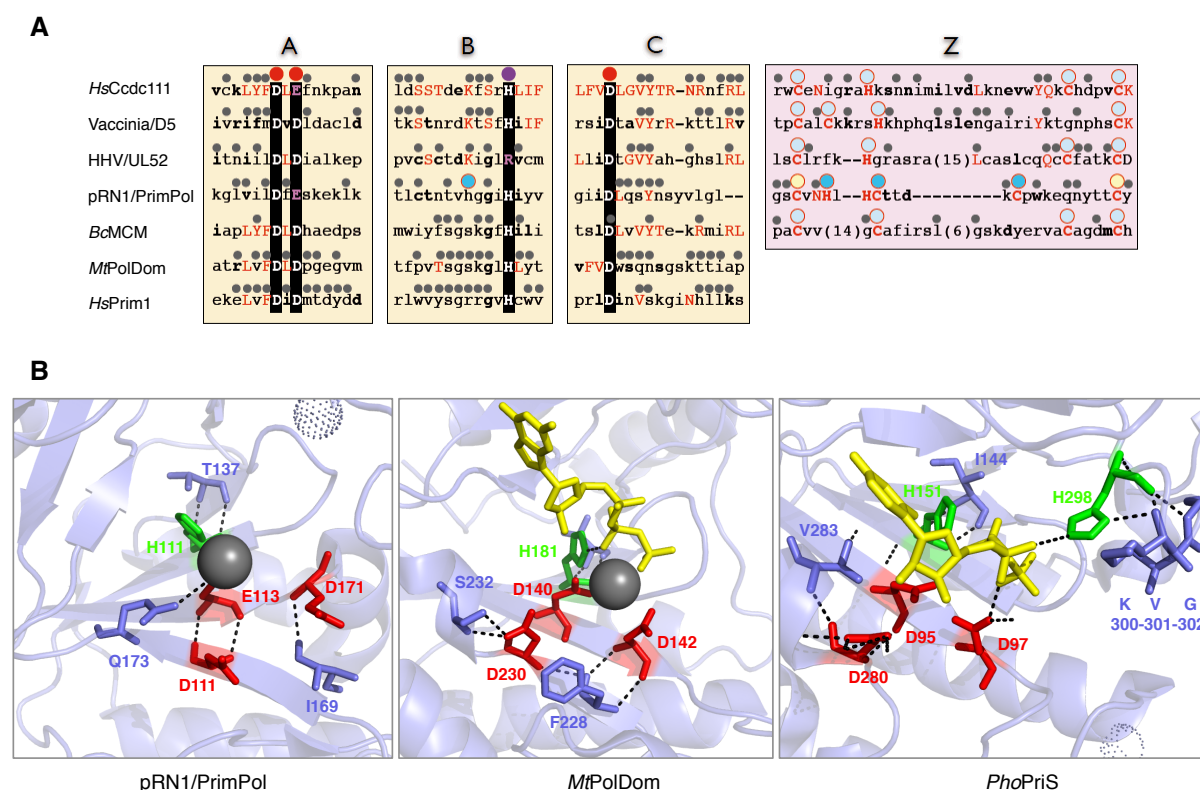


Figura 57. Centro activo de las AEPs. A. Regiones conservadas de proteínas de la superfamilia AEP. Tres regiones conservadas, denominadas A, B y C, forman el centro activo de los ejemplos de AEP utilizados: PrimPol humana (*HsCcdc111*); primasa del virus vaccinia (*Vaccinia/D5*); primasa del Herpesvirus humano (*HHV/UL52*); PrimPol del plásmido pRN1 de *Sulfolobus islandicus* (pRN1/PrimPol); PrimPol de *Bacillus cereus* (*BcMCM*); dominio de polimerización de LigD de *Mycobacterium tuberculosis* (*MtPolDom*) y subunidad pequeña de la primasa humana (*HsPrim1*). Adicionalmente se señala el dominio dedo de zinc (Z) compartido por algunas AEPs. Los puntos rojos señalan los ligandos del metal, en morado el posible residuo de unión al nucleótido y en azul los residuos que coordinan el zinc. Los puntos grises indican residuos invariantes dentro de cada grupo dentro de la superfamilia de AEPs y los residuos que son conservados o idéntico a *HsCcdc111* (PrimPol) se señalan en negrita o en rojo respectivamente. **B.** Estructura del centro activo de PrimPol del plásmido pRN1 de *S. islandicus* (pRN1/PrimPol), en el panel izquierdo (PDB 1RO2); domino polimerasa de LigD de *M. tuberculosis* (*MtPolDom*), en el panel central (PDB 2IRY); subunidad pequeña de la primasa de *Pyrococcus horikoshii* (*PhoPriS*), en el panel derecho (PDB 1V34). Se muestran en rojo los aspárticos catalíticos, en verde la histidina y en azul los residuos con los que ambos interaccionan. Se indica el metal en gris y el nucleótido en amarillo cuando está presente en el cristal proteico.

5

***Implicación de PrimPol en
tolerancia a lesiones en el DNA***

5.1 Tolerancia al daño oxidativo

La exposición a fuentes de energía exógenas y endógenas causan daño oxidativo en las macromoléculas celulares, incluyendo el DNA. Esto produce una acumulación de daño oxidativo en las bases del DNA, y por ello para mantener la integridad genómica existen sistemas de reparación de este tipo de daños. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se forman constantemente durante el funcionamiento normal del metabolismo celular. Las rutas y eventos que producen ROS incluyen el metabolismo peroxisomal, la síntesis enzimática del óxido nítrico, los leucocitos fagocíticos, las altas temperaturas, la luz ultravioleta (UV), los fármacos, la radiación ionizante y componentes de reacciones redox (Bohr 2002). Las especies ROS que más frecuentemente se forman son peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). Las especies ROS causan diferentes daños en el DNA incluyendo lesiones abundantes como es el caso de la oxidación de la base nitrogenada guanina a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG). Estos daños oxidativos son reparados mediante los mecanismos de reparación por escisión de base (BER) y reparación por escisión de (oligo)nucleótido (NER). Si las lesiones persisten en el DNA pueden causar el bloqueo de la horquilla de replicación, por lo que existen DNA polimerasas especializadas en sintetizar a través de esas lesiones y así poder continuar con el proceso de replicación.

5.1.1 Síntesis a través de 8oxoG en el molde

Una de las formas más comunes de daño oxidativo, el 8oxoG, se produce entre 10^3 y 10^4 veces por célula y día (Beckman & Ames 1997; Helbock et al. 1998). Esta es una lesión peligrosa para la célula, ya que puede ser mutagénica, causando transiciones G:C a T:A (Moriya 1993). Esto se debe a que la base 8oxoG puede adoptar dos configuraciones, apareando tanto con la base nitrogenada citosina (configuración *anti*) como con adenina (configuración *syn*) (Fig. 58).

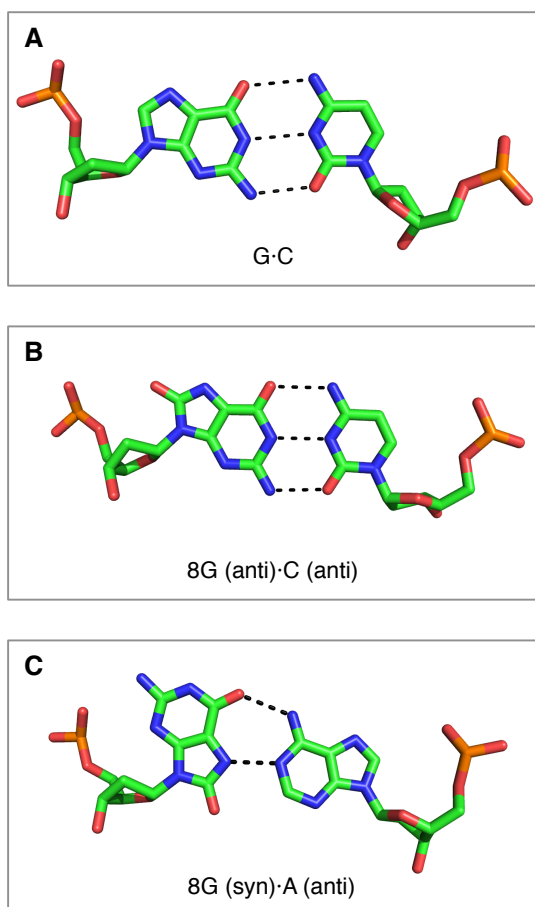


Figura 58. Estructura de los apareamientos posibles de la base 8oxoG. A. Apareamiento de Watson y Crick entre las bases dG y dC. Los puentes de hidrógeno entre las bases se representan como líneas de puntos. **B.** Estructura del apareamiento entre las bases 8oxoG y dC (PDB: 1U48). **C.** Apareamiento entre las bases 8oxoG y dA (PDB: 178D).

Para averiguar si PrimPol es capaz de sintetizar a través de la lesión 8oxoG presente en el molde utilizamos una molécula molde/iniciador en la que el extremo 3' del iniciador está a tres nucleótidos de distancia de la base dañada. De esta forma nos aseguramos que la enzima ya está en marcha (*running-start*) en el momento de enfrentarse a la base dañada, para una mejor comparación con el control sin daño. En la figura 59 se puede observar que PrimPol tiene la misma eficiencia copiando el DNA normal (panel izquierdo) que el DNA con el daño 8oxoG (panel derecho).

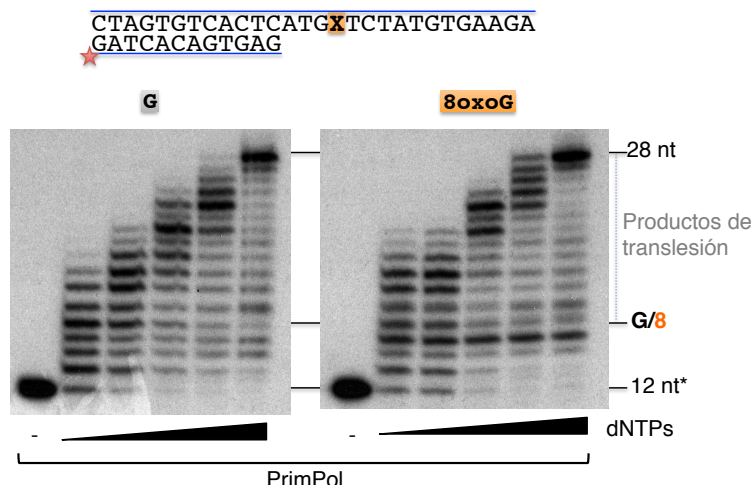


Figura 59. Síntesis a través de la lesión 8oxoG en el molde. Ensayo polimerasa sobre molde/iniciador que contiene una G normal (panel izquierdo) y un 8oxoG (panel derecho) en tercera posición respecto al extremo 3' del iniciador y concentraciones crecientes de dNTPs (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μ M).

El 8oxoG es un daño muy común en el DNA que no provoca distorsión en la doble hélice por lo que polimerasas de todas las familias consiguen sintetizar con mayor o menor eficiencia y fidelidad a través de él. Entre las polimerasas de translesión destacan Pol η que incorpora preferentemente dC mientras que Pol κ inserta dA mejor que dC (Satya Prakash et al. 2005). Dentro de las polimerasas de la familia X Pol β incorpora dC, Pol λ dA y dC por igual (Picher & Blanco 2007) y Pol μ incorpora dA y rA (Zhang et al. 2002; Martin et al. 2013). También las polimerasas replicativas consiguen “copiar” 8oxoG en el molde siendo más propensas a incorporar dA (Hübscher & Maga 2011). Poly, la polimerasa replicativa mitocondrial, incorpora en su mayoría dC pero también dA en un 10% de los casos (Hanes et al. 2006).

Para evaluar qué nucleótido inserta PrimPol frente a 8oxoG se utilizó una estructura molde/iniciador donde el extremo 3' del iniciador termina justo antes del 8oxoG (o de una base dG no dañada como control), y se adicionaron cantidades crecientes de cada dNTP de forma individual (Fig. 60). PrimPol fue capaz de introducir tanto dC (usando la configuración *anti* del 8oxoG) como dA (usando la configuración *syn* del 8oxoG); la inserción que se observa de dG (también en el molde control) es seguramente debida a la copia de la dC contigua al 8oxoG en el molde. Por tanto, las reacciones de tolerancia a 8oxoG llevadas a cabo por PrimPol pueden estar libres de errores (en el caso de introducir dC), o ser mutagénicas (al insertar dA) y promover transversiones dG:dC a dT:dA. Ambas opciones de inserción frente a 8oxoG ocurren con una frecuencia similar.

GACGTCGACTACGCGXCATGCCTAGGGGCCCATG
 CTGCAGCTGATGCGC

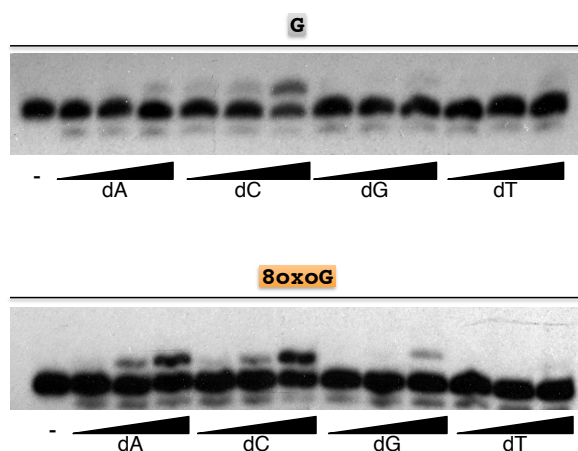


Figura 60. Incorporación de los diferentes dNTPs frente a 8oxoG. Ensayo polimerasa de adición de un solo dNTP (0.01, 0.1, 1 μ M) frente a G control u 8oxoG en el molde.

Debido a que PrimPol usa tanto dNTPs como NTPs se evaluó la posibilidad de utilizar ribonucleótidos para llevar a cabo la síntesis a través de una lesión 8oxoG en el molde. Los NTPs fueron proporcionados en unos márgenes de concentración 100 veces superiores a los dNTPs, teniendo en cuenta los valores de abundancia relativa *in vivo* de ambos tipos de sustratos. En este caso, PrimPol fue capaz de insertar tanto C como A frente a 8oxoG, pero teniendo una preferencia por insertar A 1,5 veces superior a la inserción de C (Fig. 61). Por otra parte, y dentro de los márgenes de abundancia relativa *in vivo*, eficiencias similares en la reacción de translesión de 8oxoG requirieron una concentración 100 veces mayor de C que de dC y 300 veces mayores de A que de dA.

GACGTCGACTACGCGXCATGCCTAGGGGCCCATG
 CTGCAGCTGATGCGC

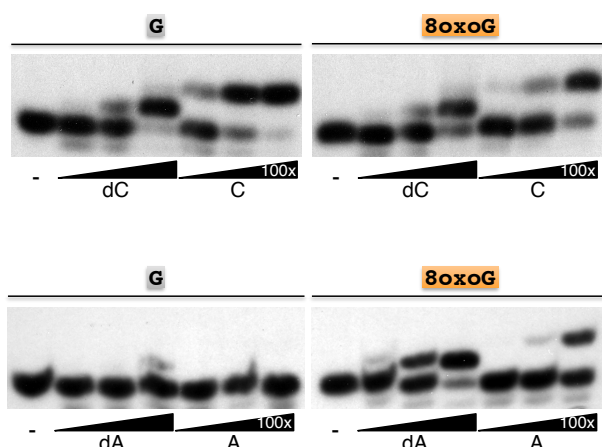


Figura 61. Incorporación de NTPs frente a 8oxoG. Ensayo polimerasa donde se compara la inserción de un dNTP (dC o dA; 0.01, 0.1 y 1 μ M) con la de un NTP (C o A; 1, 10 y 100 μ M) frente a 8oxoG o una base (dG) no dañada.

5.1.2 Síntesis usando 8oxo-dGTP y 8oxo-GTP como sustrato

Cuando se produce la oxidación de la guanina esta puede encontrarse formando parte de la estructura del DNA (8oxoG) o como nucleótido libre en la célula, pudiendo ser desoxirribonucleótidos (8oxo-dGTP) o ribonucleótidos (8oxo-GTP). Se evaluó la capacidad de PrimPol de insertar 8oxo-dGTP frente a la base molde dC y dA (Fig. 62, panel superior). La primera conclusión fue que PrimPol

no utiliza con la misma eficiencia el nucleótido oxidado frente a los nucleótidos no dañados, dGTP o dTTP. 8oxo-dGTP se incorpora 150 veces peor frente a dC que el dGTP, e igual frente a dA que el dTTP. Cuando comparamos la incorporación de 8oxo-dGTP frente a dA o dC, el nucleótido modificado se inserta 100 veces mejor frente a dA que frente a dC. Esto tendría consecuencias mutagénicas ya que en sucesivas rondas de replicación provocaría la transversión dG:dC a dT:dA. Dicha preferencia por introducir 8oxo-dGTP frente a dA es un hecho general ya que este nucleótido oxidado se encuentra en solución mayoritariamente en conformación *syn* y por tanto es propenso a aparearse con dA (Jang et al. 2002).

Se evaluó del mismo modo la incorporación de 8oxo-GTP frente a dC y dA en comparación con los correspondientes ribonucleótidos. Se observa una inserción 10 veces peor del ribonucleótido oxidado frente a dC en comparación al GTP, mientras que frente a la dA no se observa inserción del 8oxo-GTP (Fig. 62, panel inferior).

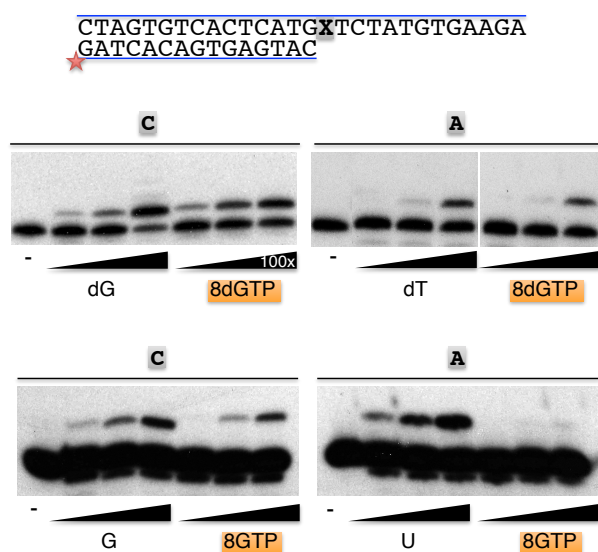


Figura 62. Uso de los nucleótidos oxidados 8oxo-dGTP y 8oxo-GTP. Ensayo polimerasa sobre estructuras molde/iniciador con C o A como base molde para la inserción de dGTP (0.01, 0.1 y 1 μ M); 8dGTP (1, 10 y 100 μ M); dTTP (0.01, 0.1 y 1 μ M); 8dGTP (0.01, 0.1 y 1 μ M). Utilizando los mismos sustratos se evaluó la entrada de GTP (1, 10 y 100 μ M); 8GTP (1, 10 y 100 μ M); UTP (1, 10 y 100 μ M); 8GTP (1, 10 y 100 μ M).

5.1.3 8oxoG en primasa

Para evaluar la capacidad de primar en condiciones de daño oxidativo se valoró la presencia de 8oxoG en el molde, y como nucleótido libre. Ya que la base 8oxoG en el molde puede ser reconocida como dG y como dT, se sintetizó un nuevo oligonucleótido molde para la actividad primasa de PrimPol, en el que la base crítica (dG) fue sustituida por 8oxoG. El molde original (Gtcc) fue comparado con el molde con 8oxoG (8tcc), así como con el molde mutante en el que la base crítica había sido mutada a dT (Ttcc). Según se observa en la figura 63A, el 8oxoG parece ser principalmente reconocido como dG, dando un patrón de síntesis similar al del oligo Gtcc. Para comparar con más detalle la eficiencia de reconocimiento de 8oxoG frente a dG se evaluó la actividad primasa en un rango variable de dGTP (nucleótido 3' del dinucleótido), observándose una actividad equivalente (Fig. 63B).

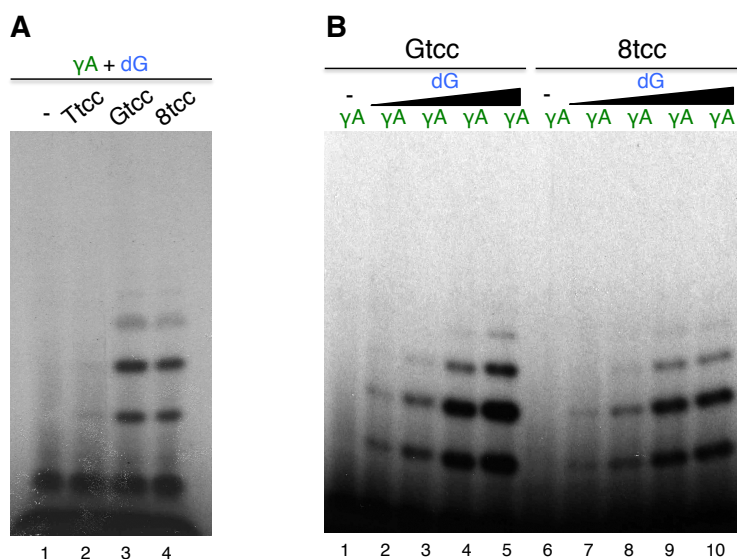


Figura 63. Ensayo primasa sobre oligonucleótidos Gtcc y su modificación 8tcc. **A.** Ensayo primasa sobre los moldes Ttcc, Gtcc y 8tcc (que contiene 8oxodG como base críptica), utilizando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dGTP (1 μM). **B.** Ensayo primasa sobre moldes Gtcc y 8tcc usando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y concentraciones crecientes de dGTP (0.1, 1, 10 y 100 μM).

Con la finalidad de probar si la presencia de la base oxidada 8oxoG en un molde de DNA es una señal suficiente para estimular la actividad primasa de PrimPol sobre cualquier secuencia, se examinó la actividad primasa sobre un oligo molde heterogéneo, conteniendo o no 8oxoG. El oligo utilizado fue el mismo que se ha utilizado como molde para los ensayos de polimerización. Como se puede observar en la figura 64, las diferentes combinaciones de dNTPs y NTPs utilizadas permiten concluir que no existe primado alrededor del 8oxoG de la secuencia.

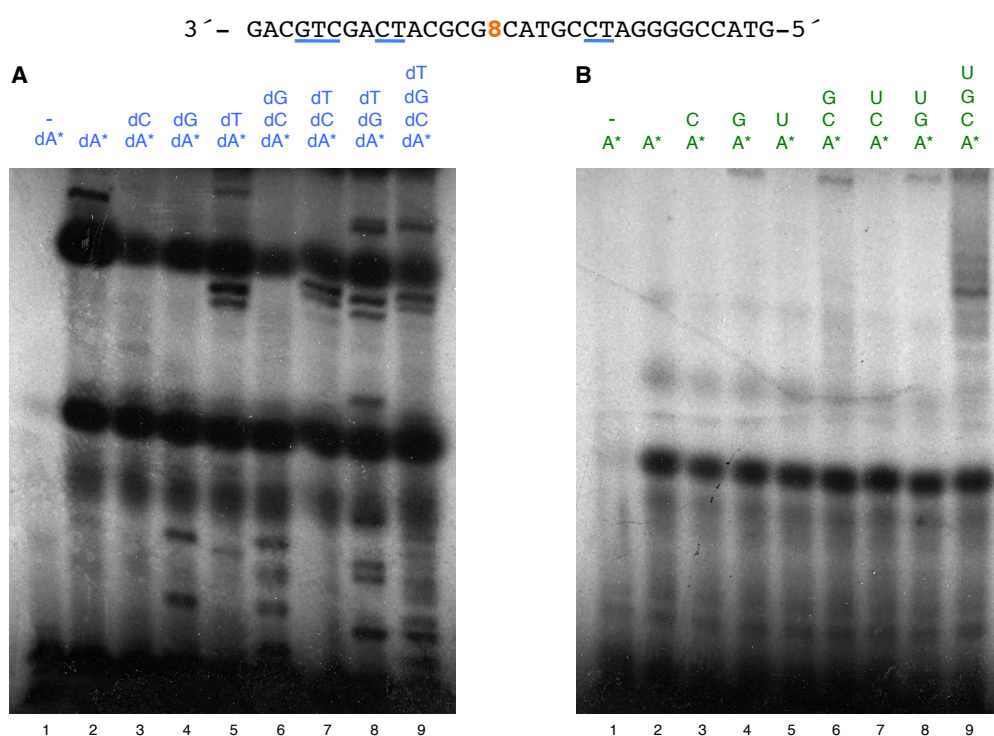


Figura 64. Actividad primasa sobre un molde heterogéneo que contiene 8oxoG. **A.** Ensayo primasa utilizando el molde T4-8oxoG y las combinaciones indicadas de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (16 nM) y dNTPs (10 μM). **B.** Ensayo primasa utilizando el mismo molde y las combinaciones indicadas de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y NTPs (10 μM).

Por otra parte, se evaluó la capacidad del 8oxo-dGTP de servir como nucleótido libre durante la formación de iniciadores por PrimPol, evaluándose su incorporación frente a dC y dA. Así, la incorporación de 8oxo-dGTP frente a dC en el oligo Gtcc fue claramente menor que la de dGTP, así como los correspondientes productos de elongación (Fig. 65A). La incorporación de 8oxo-dGTP frente a dA fue parecida a la de dTTP (Fig. 65B carriles 3 y 5, Fig. 65C carril 3). Cuando se analizó la extensión de los pares formados dC:8oxodGMP y dA:8oxodGMP, se observó una diferencia entre ellos. El par dA:8oxodGMP se extendió con la misma eficiencia que el par dA:dTMP (Fig. 65B), mientras que el par dC:8oxodGMP no pudo ser extendido (Fig. 65C).

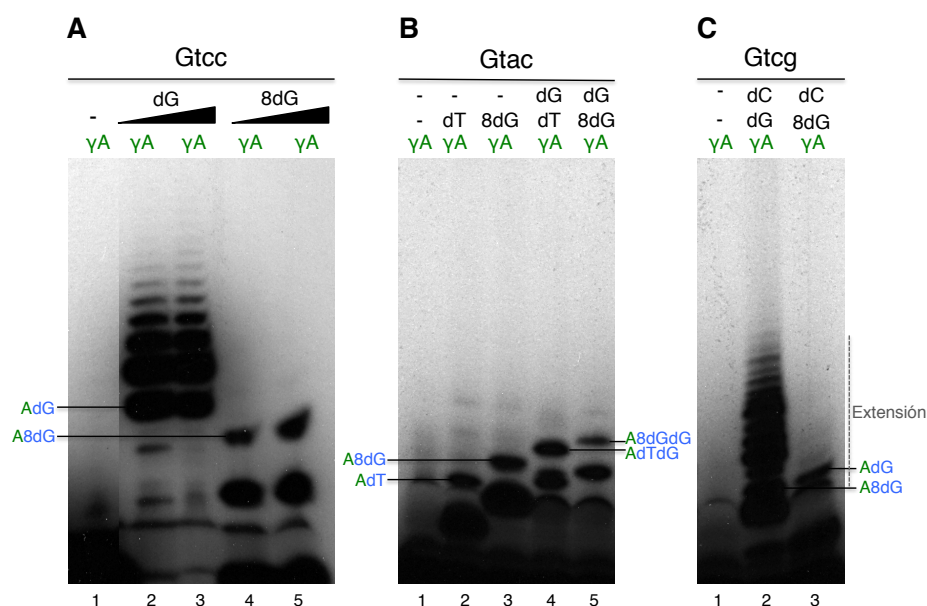


Figura 65. Actividad primasa utilizando 8oxodGTP y la extensión del mismo. **A.** Ensayo primasa sobre el molde Gtcc usando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16nM) y dGTP o 8oxodGTP (10, 100 μM). **B.** Ensayo primasa sobre el oligo Gtac utilizando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dNTPs o 8oxodGTP (10 μM). **C.** Actividad primasa sobre el molde Gtcg usando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dNTPs o 8oxodGTP (10 μM).

5.2 Síntesis a través de moldes con sitios abásicos

Los sitios abásicos (apurínicos, apirimidínicos) son una de las lesiones del DNA más abundantes en las células (Friedberg et al. 2006). Los sitios abásicos derivan de un corte en el enlace N-glucosídico en el DNA que puede ocurrir de forma espontánea, química y enzimática durante la reparación tipo BER. Los sitios abásicos que escapan de la reparación por BER o NER inducen fuertes bloqueos de la replicación y son altamente mutagénicos debido a la falta de información intrínseca a este tipo de lesiones. El sitio abásico no altera la estructura de la hélice DNA-B (Fig. 66) pero induce perturbaciones locales alrededor de la lesión (Chen et al. 2008; Cuniassse et al. 1990), de modo que las polimerasas que sintetizan a través de él deben tener cierta flexibilidad para tolerar la estructura deformada del DNA alrededor del sitio abásico.

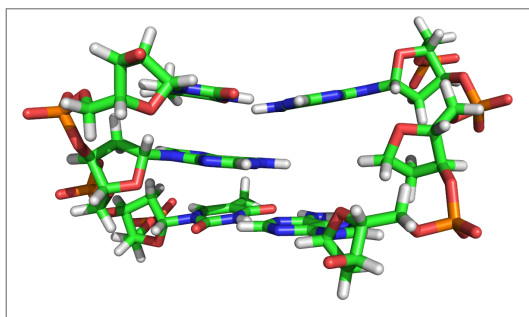


Figura 66. Estructura de una doble hélice de DNA con un sitio abásico. Estructura de apareamientos entre bases y la presencia de un nucleótido que carece de base nitrogenada (PDB: 2L2V)

Se evaluó la capacidad de PrimPol de sintetizar a través de un sitio abásico. Para ello se realizó un ensayo polimerasa con un molde conteniendo un análogo sintético del sitio abásico (tetrahidrofurano) hibridado a un iniciador cuyo extremo 3' se sitúa a tres nucleótidos de distancia de la lesión. Como se puede observar en la [figura 67](#) PrimPol fue capaz de sintetizar a través de la lesión extendiendo el 60% del iniciador.

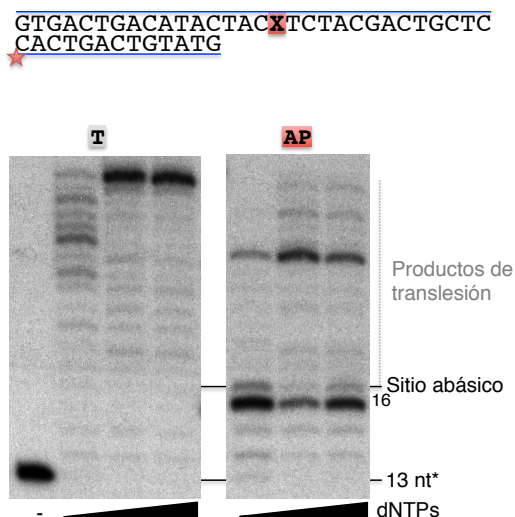


Figura 67. Síntesis a través de un sitio abásico. Ensayo polimerasa sobre una estructura molde/iniciador donde el sitio abásico se encuentra a tres nucleótidos del iniciador. En el molde control la base directora equivalente es una timina. Se proporcionaron cantidades crecientes de dNTPs (1, 10 y 100 μ M).

Se ha descrito que las polimerasas de la familia B que son capaces de sintetizar a través de sitios abásicos (Pol α y Pol δ /PCNA) obedecen la “regla de la A”, ya que seleccionan la inserción preferente de dATP frente al sitio abásico (Strauss 1991). En la familia Y de polimerasas humanas el nucleótido incorporado frente al sitio abásico es característico de cada polimerasa. Así, Pol ι incorpora dT, dG y dA; Pol η , dT y dA; REV1, dC; y Pol κ , dA. Aunque las polimerasas de la familia Y pueden insertar otras bases frente al sitio abásico la “regla de la A” podría prevalecer ya que el par abásico:dAMP es el que es extendido con mayor eficiencia (Choi et al. 2010).

Se evaluó la inserción de los cuatro posibles nucleótidos utilizando una estructura molde/iniciador donde el sitio abásico se encuentra dirigiendo la primera inserción ([Fig. 68](#)). Como se muestra en la parte A de la figura, cuando se utilizó una concentración baja de cada nucleótido (0,1 y 1 μ M), PrimPol no logró insertar ninguna de las cuatro bases frente al sitio abásico del molde. Sin embargo, cuando se forzó la concentración de dNTPs, hasta el punto de observarse una adición reiterativa de dA, o incluso la de dG sobre la molécula control, no dañada, PrimPol insertó una pequeña cantidad de cada dNTP frente al sitio abásico, preferentemente dA y dG, al igual que ocurría en el molde no dañado.

Para comprobar si esta incorporación siguió la “regla de la A”, o fue dirigida por la siguiente base (una dT), se realizó un ensayo de extensión del iniciador favoreciendo a lo largo del tiempo la copia total del molde. El producto final obtenido tuvo un nucleótido menos, lo que indica que el sitio abásico no fue “copiado” ([Fig. 69](#)). Además, se evaluó también el paso por un doble sitio abásico siendo su extensión de un 60% en comparación con el casi 80% que se observa en la extensión de un único sitio abásico en este experimento.

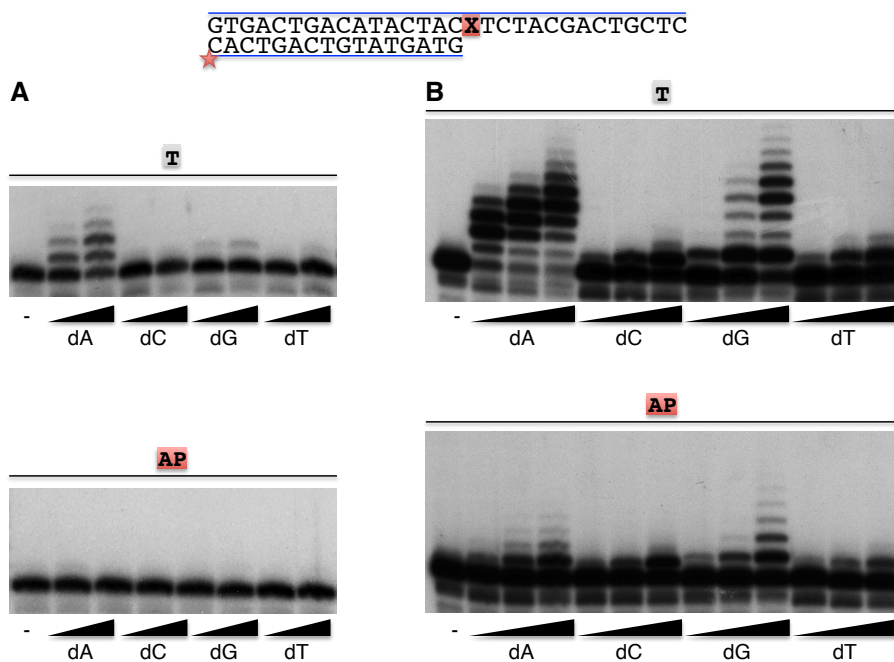


Figura 68. Inserción de cada dNTP frente al sitio abásico. Ensayo polimerasas donde la primera posición del molde presenta un sitio abásico. **A.** Se analizó la incorporación de cada dNTP (0,1 y 1 μ M), añadido independientemente. **B.** Se analizó la incorporación de cada dNTP (1, 10 y 100 μ M), añadido independientemente.

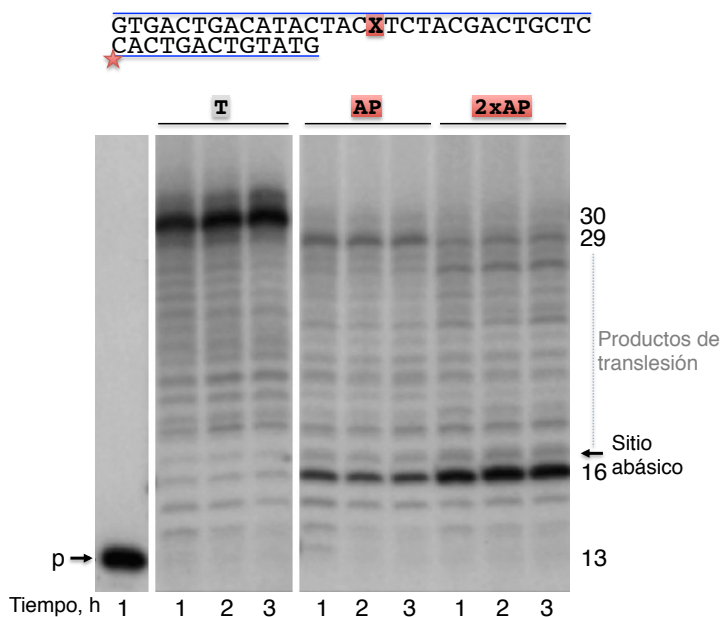


Figura 69. Síntesis a través del sitio abásico a lo largo del tiempo. Se ensayó la PrimPol frente a uno o dos sitios abásicos con dNTPs (100 μ M) y se incubó durante una, dos o tres horas con la finalidad de observar el tamaño del producto final.

A continuación se estudió la posibilidad de que PrimPol use ribonucleótidos para tolerar este tipo de lesión. De modo que se usaron estructuras tipo molde/iniciador donde el sitio abásico se encuentra en la primera posición a copiar y se varió la posición siguiente (la base directora potencial). Se evaluó la inserción de cada uno de los cuatro NTPs frente a los cinco moldes posibles (Fig. 70, paneles superiores), así como la inserción de los correspondientes dNTPs como control (Fig. 70, paneles inferiores). Como se puede observar en la figura 70, PrimPol no es capaz de usar ribonucleótidos para sintetizar a través de un sitio abásico.

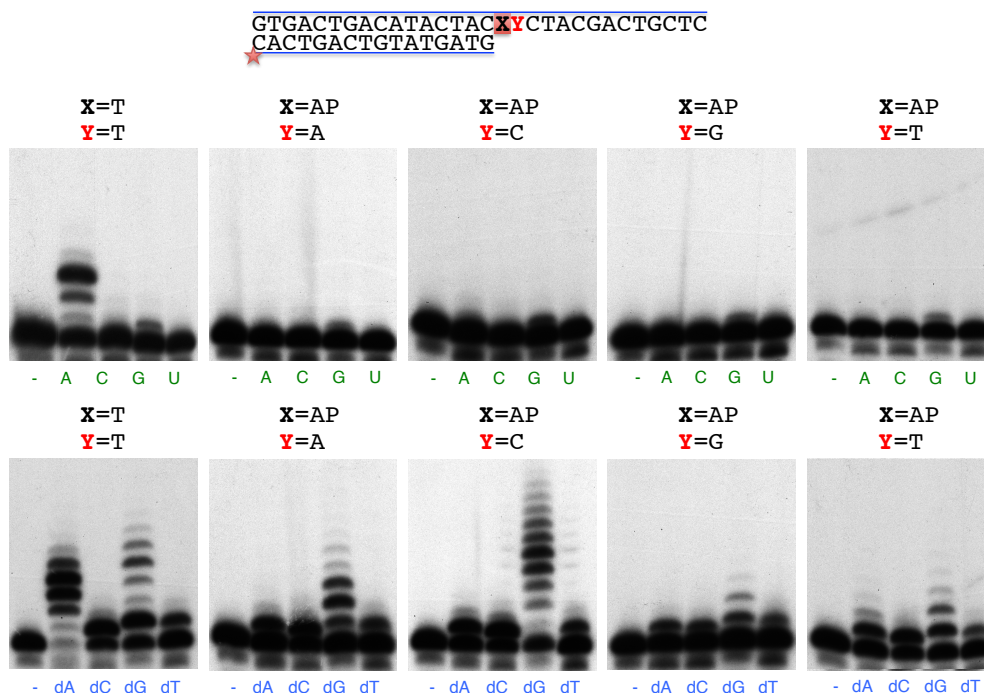


Figura 70. Síntesis sobre estructuras molde/iniciador con un sitio abásico y las cuatro posibles bases tras él con NTPs y dNTPs. Se realizaron ensayos polimerasa sobre estructuras que contienen el sitio abásico como primer evento de copia y cada una de las cuatro bases en la posición siguiente. Estos ensayos se realizaron con NTPs (100 μ M) y también dNTPs (100 μ M) como control.

Se repitió el mismo tipo de experimentos de tolerancia de un sitio abásico con dNTPs, pero esta vez utilizando un primer más corto, cuyo extremo 3' se encuentra a tres nucleótidos de distancia del sitio abásico. Como se observa en la [figura 71](#), la síntesis a través de la posición correspondiente al sitio abásico se vio influenciada por la identidad de la base posterior. Así, si esta base es dT, dA o dC PrimPol produce un patrón de extensión similar; sin embargo si la base es dG la eficiencia de translesión es menor, como ya se podría anticipar del experimento mostrado en la [figura 71](#), en el que queda clara la mayor dificultad de insertar dC en esas circunstancias.

Por todo lo observado, PrimPol está al nivel de algunas DNA polimerasas de la familia Y en cuanto a su capacidad de polimerizar a través de un sitio abásico.

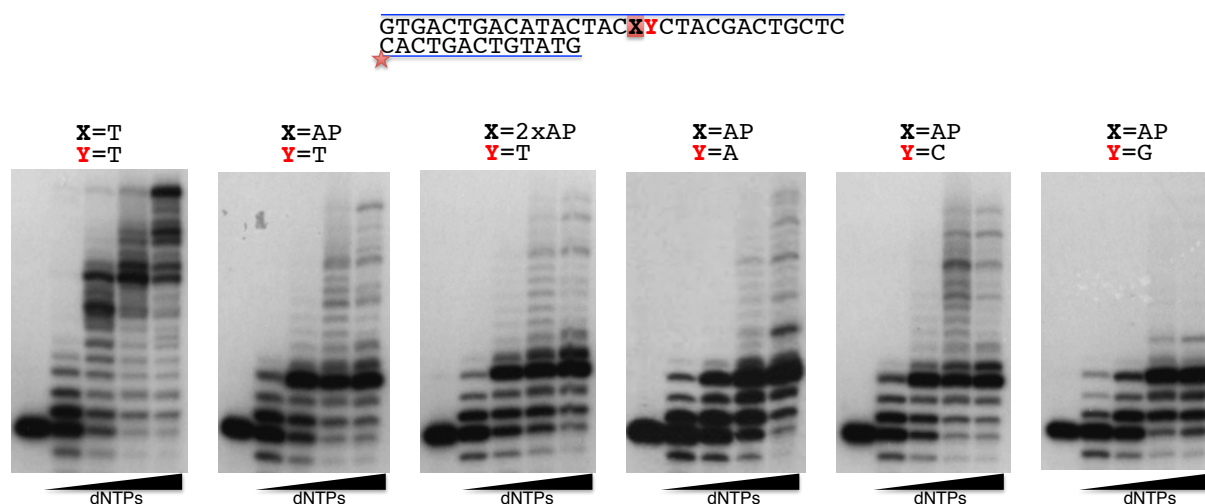


Figura 71. Síntesis a través de un sitio abásico cambiando la base posterior. Ensayo polimerasa con dNTPs (0.1, 1, 10 y 100 μ M) donde el daño (uno o dos sitios abásicos) se encuentra tres nucleótidos *upstream* del iniciador y se cambia la base posterior, probando las cuatro posibilidades.

5.2.1 Actividad primasa sobre sitios abásicos

Debido a la capacidad de PrimPol de tolerar sitios abásicos por medio de su actividad DNA polimerasa, nos planteamos si sería posible que PrimPol iniciase la síntesis frente o cerca de este daño en el DNA. Para ello, se realizaron ensayos primasa utilizando únicamente la cadena molde de los sustratos utilizados anteriormente, conteniendo o no un sitio abásico. Como se puede observar en la [figura 72A](#), el dinucleótido AdG formado sobre el oligo control (T) no aparece en el oligo con el sitio abásico (AP), lo que sugiere que esa reacción ocurre frente al molde “TC” contenido en la secuencia ...CTTCT..., pero no lo hace sobre la secuencia ...C(AP)TCT.... Además, en la [figura 72B](#) donde se evalúa la actividad DNA primasa con la mezcla de los 4 dNTPs, y por tanto la iniciación puede ocurrir en varias posiciones del oligonucleótido molde, los patrones fueron muy similares, independientemente de la presencia del sitio abásico, lo que nos permite concluir que la presencia de este daño no ejerce una estimulación de la actividad primasa de la proteína.

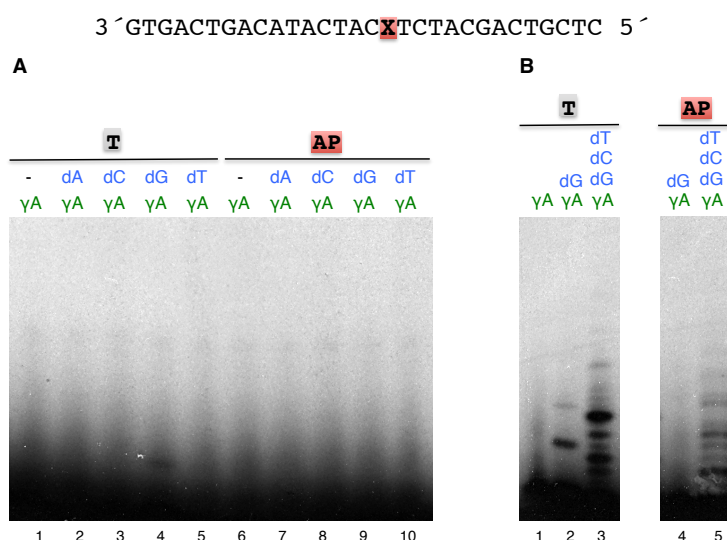


Figura 72. Ensayo primasa sobre un molde que contiene un sitio abásico. **A.** Ensayo primasa sobre molde normal (T) y con daño (X) utilizando combinaciones de dos nucleótidos [γ - 32 P]ATP (16 nM) y cada dNTP (10 μ M). **B.** Ensayo primasa sobre molde control y con daño con la combinación [γ - 32 P]ATP (16 nM) y dGTP (10 μ M) y [γ - 32 P]ATP (16 nM) y dGTP, dCTP, dTTP (10 μ M).

5.3 Síntesis a través de dímeros de timinas

La radiación UV induce la formación de uniones covalentes entre las bases de pirimidinas adyacentes, timinas o citosinas. La mayoría de las lesiones causadas son dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs; 80-90%) ([Fig. 73A](#)) y fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4 PPs; 10-20%) ([Fig. 74B](#)) (Yang 2011). Se han encontrado múltiples vías de reparación para estas lesiones desde bacterias, fagos y arqueas hasta plantas y humanos. La reparación más sencilla es la llevada a cabo por la fotoliasa que usa la luz visible para revertir la unión covalente entre las bases. Estas fotoliasas específicas se encuentran en bacterias, plantas y vertebrados inferiores (Sancar 2003). En algunas bacterias y fagos existe una glicosilasa que elimina el CPD del DNA y, posteriormente, se termina la reparación por la vía BER (Lindahl 2001). En cualquier caso, la principal vía de reparación de esta lesión utiliza el mecanismo de NER (Friedberg 2011). Al contrario de lo que ocurre cuando se utilizan fotoliasas o glicosilasas específicas (BER), la maquinaria de reparación por NER es la misma para una gran variedad de lesiones.

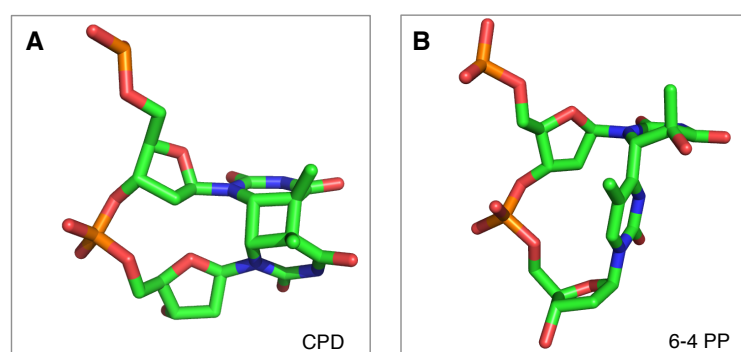


Figura 74. Estructura de lesiones en timinas unidas de forma covalente. A. Estructura de un CPD (PDB: 3SI8(1)). **B.** Estructura de un 6-4 PP (6-4 PP) (PDB: 3EI1).

Las lesiones de UV, tanto CPDs como 6-4 PPs, no reparadas bloquean la horquilla de replicación. En este caso las células dependen de dos mecanismos para tolerar esta lesión durante la replicación. Uno de ellos es la recombinación homóloga, que implica un cambio transitorio de molde entre cromátidas hermanas para esquivar la lesión (Budzowska & Kanaar 2009). El otro es mediante la acción de polimerasas especializadas, como UmuCD' en bacterias y Pol η en eucariotas, que realizan la síntesis a través de la lesión (TLS) (Lehmann 2000; Yang & Roger Woodgate 2007).

Una vez demostrada la capacidad de PrimPol de realizar síntesis a través de las lesiones 8oxoG y sitios abásicos, nos planteamos su posible implicación en la tolerancia de dímeros de timina. Se llevó a cabo un ensayo polimerasa con una estructura molde/iniciador donde el molde contiene un CPD situado a tres nucleótidos de distancia respecto al extremo 3' del DNA iniciador. Como control se utilizó un molde equivalente, sin daño. En la figura 75 se observa que PrimPol logra polimerizar a través del dímero de timinas aunque se detecta una acumulación de dos productos: la extensión hasta la lesión (21 nt), y el correspondiente a un evento adicional de extensión, quizás frente a la lesión (22 nt).

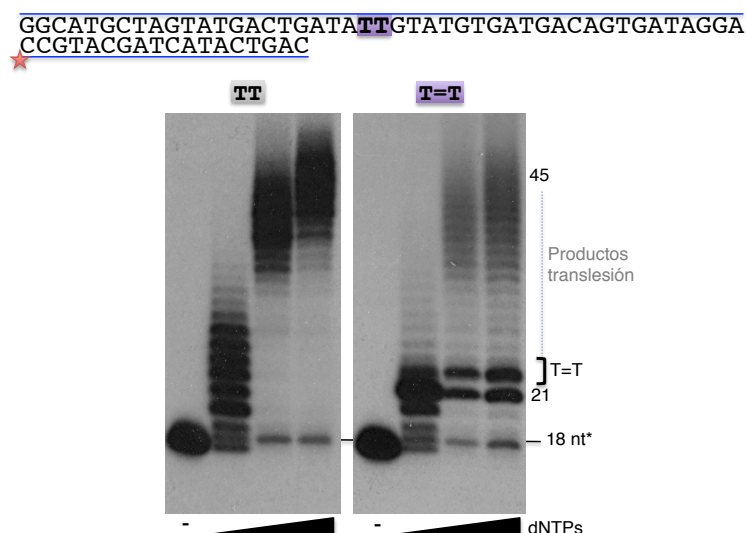


Figura 75. Síntesis a través de un dímero de timinas en el molde. Actividad polimerasa usando dNTPs (1, 10 y 100 μ M) sobre una estructura molde/iniciador donde el molde contiene un ciclobutano que se encuentra tres nucleótidos de distancia desde el extremo del iniciador.

En un estudio posterior, se intentó determinar la naturaleza de los nucleótidos insertados por PrimPol frente al dímero de timinas. Entre las polimerasas de TLS se sabe que principalmente Pol η se encarga de copiar esta lesión de manera correcta (introduciendo As) y que su falta de actividad

produce una enfermedad de hipersensibilidad a la luz denominada Xeroderma Pigmentoso Variante (Masutani et al. 1999; Johnson et al. 1999). Otras polimerasas como Pol ζ y Pol ι son capaces de copiar la segunda dT (5') de esta lesión, llevando a cabo una síntesis mutagénica: Pol ζ incorpora dG (Nelson et al. 1996) y Pol ι , dG o dT (Tissier et al. 2000).

Como se muestra en la [figura 76](#), PrimPol produce principalmente 2 bandas de extensión con dATP sobre el molde dañado (panel derecho), lo que sugiere que es capaz de copiar ambas dTs, (3' y 5') de la lesión. En la [figura 76](#) también se puede observar que la adición de los otros 3 nucleótidos, tanto independientemente como en parejas, produce bandas de extensión que no difieren entre el molde control y el molde dañado, por lo que deben corresponder a errores de inserción o dislocaciones no específicas de esa lesión. Únicamente, es interesante considerar que la inserción de la G puede estar ocurriendo frente a la primera T del molde (esté o no dañada), formando un pseudo-apareamiento.

También se puede observar que los carriles que contienen dA en combinación con dC (el siguiente nucleótido a ser insertado), o con dT (que podría pseudo-aparear frente a dG), producen una mayor escalera de productos, tanto en el molde sin daño como en el que contiene el CPD. Esto de nuevo sugiere que la lesión puede ser tolerada por medio de la inserción de dATP frente a las Ts del CPD.

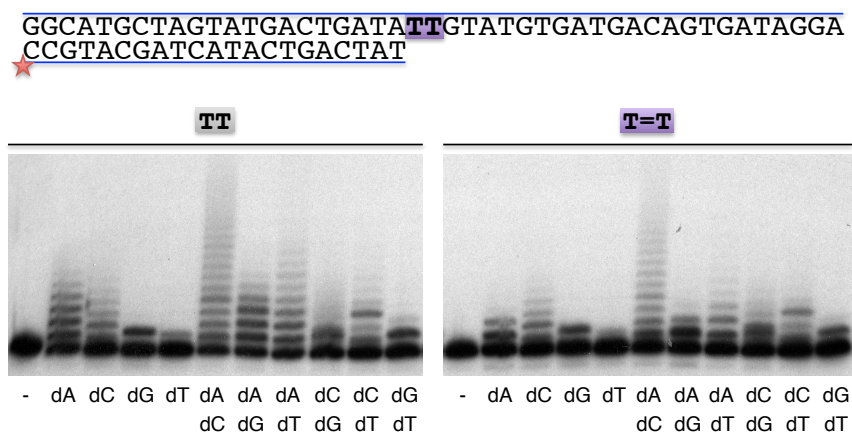


Figura 76. Inserción frente a un CPD. Se valoró la inserción de cada dNTP (100 nM) o utilizando combinaciones de dos nucleótidos (100 nM).

Para corroborar esto se realizaron experimentos con estructuras molde/iniciador donde la dT del 3' ya se encuentra previamente apareada con dA o dG ([Fig. 77A](#)). PrimPol pudo completar la copia del dímero de timina, o esquivar la segunda dT, pero en cualquier caso continuar la síntesis, solo si la primera dT del CPD (3') está apareada con dA pero no con dG. Además, cuando preparamos un iniciador que cubre las dos bases del CPD, de forma que la primera dT del CPD aparee con dA o dG, y la segunda dT del CPD está correctamente apareada con dA ([Fig. 77B](#)), PrimPol puede continuar la síntesis en ambos casos.

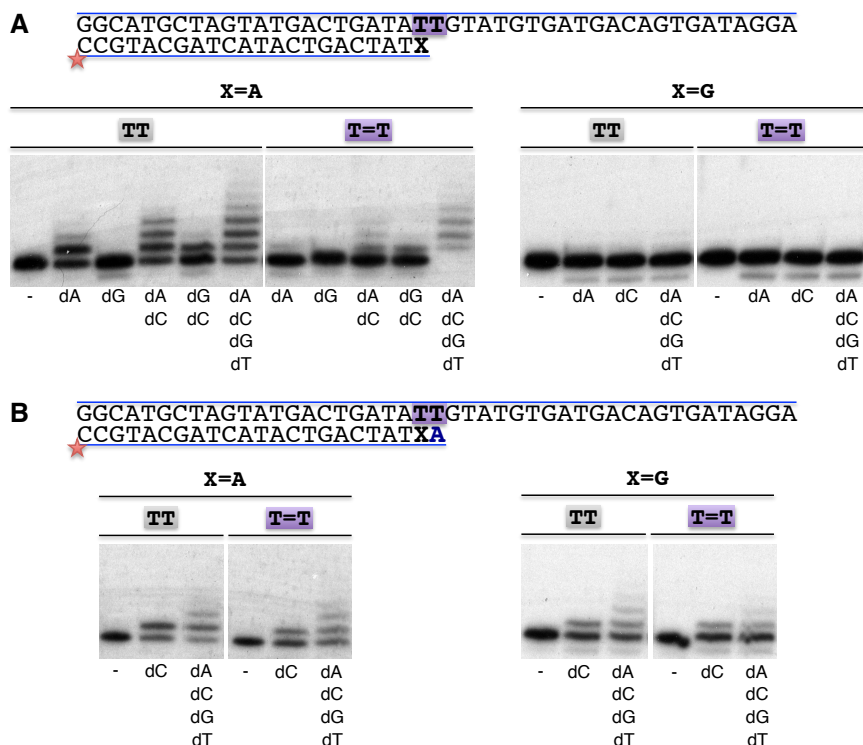


Figura 77. Extensión de los nucleótidos frente al dímero de timinas. **A.** Actividad polimerasa sobre una estructura molde/iniciador que contiene un dímero de timinas y donde la dT en 3' se encuentra apareada con dA o dC utilizando las combinaciones de dNTPs indicadas (100 nM). **B.** La estructura molde/iniciador contiene un dímero de timinas y donde la dT en 3' se encuentra apareada con dA o dC y la dT en 5' aparea con dA y se lleva a cabo la extensión con el siguiente dNTP requerido (dCTP 100 nM) o con los cuatro dNTPs (100 nM).

5.3.1 Dímeros de timinas y actividad primasa

Se probó, de igual modo que con los daños anteriores, la posibilidad de que la presencia de una lesión en el molde potencie la actividad primasa de la enzima de forma específica sobre el sustrato dañado. En el ensayo se intentan identificar dinucleótidos que pudieran ser sintetizados sobre el dímero de timinas por lo que se proporciona: $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dA}$ y ATP para posibilitar una copia fiel del dímero; $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dA}$ y GTP, pues hemos visto que PrimPol puede incorporar dG frente a la dT; $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dA}$ y CTP, que podría permitir la síntesis de un iniciador de tres nucleótidos ya que copiaría el dímero y la siguiente base. En la figura 78 se observa que no existen productos de síntesis diferenciales entre el molde control y el molde con daño, por lo que el dímero de timinas no parece actuar como una señal de reclutamiento para la actividad primasa del enzima.

3'GGCATGCTAGTATGACTGATATTGTATGTGATGACAGTGATAGGA 5'

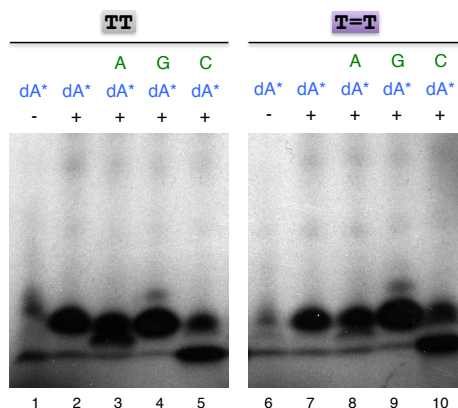


Figura 78. Actividad primasa sobre un molde que contiene un dímero de timinas. Se utilizó un molde con un CPD para llevar a cabo un ensayo primasa con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (16 nM) y NTPs (10 μM).

5.4 Síntesis a través de 5-fluorouracilo (5FU)

5-fluorouracilo (5FU) es un derivado halogenado de nucleótido con un átomo de flúor en el carbono C-5 en lugar de un átomo de hidrógeno. Fue sintetizado en 1957 por Heidelberger y cols. (Heidelberger et al. 1957) como agente antitumoral. En la actualidad se sigue utilizando en terapia antitumoral sólo o en combinación con otros fármacos (Pratt et al. 1994; Kretschmar et al. 2000; Wilke et al. 2000; Kouroussis et al. 2002; Kabbinar et al. 2003; Ohtsu et al. 2003), siendo su acción principal la inhibición de la actividad de la Timidilato Sintasa (TS). La similitud estructural entre FU y el uracilo le permite entrar en las células utilizando los sistemas de entrada de bases pirimidínicas e incorporarse en las rutas metabólicas. 5FU es convertido dentro de la célula a 5-fluorodesoxiuridinamonofofato (5FdUMP), un análogo de desoxiuridinamonofofato (dUMP) que junto con el folato reducido y la TS, forman un complejo ternario estable que causa la inhibición (Santi et al. 1974). Por otro lado, tanto el 5FdUMP como 5-fluorouridinamonofofato (5FUMP), pueden ser fosforilados a 5-fluorodesoxiuridinatrifosfato (5FdUTP) y 5-fluorouridinatrifosfato (5FUTP) pudiendo ser incorporado al DNA y RNA (Tanaka et al. 1981; Chaudhuri et al. 1958).

Otra de las principales razones por las que se emplea el 5FU como droga antitumoral es por su gran efecto mutagénico debido a apareamientos de bases incorrectos inducidos por la presencia del grupo halógeno de estos análogos de nucleótido (Hopkins & Goodman 1980). La capacidad mutagénica de los 5-halógenoderivados incorporados sobre el DNA es debida al menos a dos efectos: alteraciones en los niveles de dNTPs, y apareamientos de bases incorrectos inducidos por la presencia del grupo halógeno de estos análogos de nucleótido. De esta manera, la fuerte electronegatividad del átomo de flúor altera la densidad electrónica del anillo pirimidínico favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno con residuos de guanina (Fig. 79). En consecuencia, los halógenoderivados del uracilo favorecen la aparición de transiciones durante la replicación del genoma celular del tipo dT:dA y dC:dG.

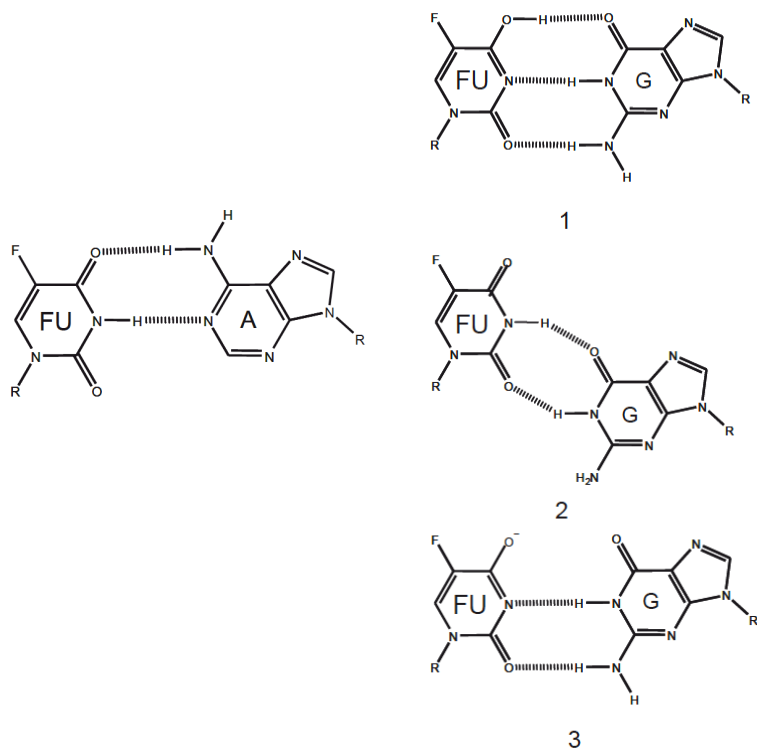


Figura 79. Promiscuidad en el apareamiento de bases por 5FU. La base modificada 5FU aparea con A con una estructura de tipo *Watson-Crick*. La naturaleza del átomo de flúor permite teóricamente a 5FU varias posibilidades de apareamiento incorrecto con G. La alta electronegatividad del flúor altera la densidad electrónica del anillo de pirimidina induciendo eventualmente una carga positiva en la molécula, incrementando la probabilidad de perder un protón en la posición N-1, lo que conduce a la transformación de la forma cetónica

(grupo=O en el C-6 del anillo) a la forma enólica (-OH) en un proceso independiente de pH. Con esta forma puede aparearse con G con una estructura de tipo *Watson-Crick* (1). 5FU en la forma cetónica (=O) puede aparearse con G con un apareamiento con estructura inestable denominada wobble o tambaleante (2). La forma cetónica (=O) puede pasar a la forma ionizada (O-) en un proceso dependiente de pH. 5FU en la forma ionizada puede aparearse con G en una estructura de tipo *Watson-Crick* (3).

Se estudió la capacidad de PrimPol de copiar 5FU en comparación con la copia que hace de T y de U. Se utilizó una estructura molde/iniciador conteniendo esa lesión como primera base molde. Como se observa en la [figura 80](#), la extensión a través de la lesión 5FU es equivalente a la realizada frente a los moldes no dañados. A continuación se probó la inserción de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos frente a la base dañada. Como se muestra en la [figura 81](#) PrimPol realiza una copia fiel del 5FU insertando exclusivamente dA frente a esa lesión, con una eficiencia ligeramente mayor que frente a dT, pero igual que frente a U.

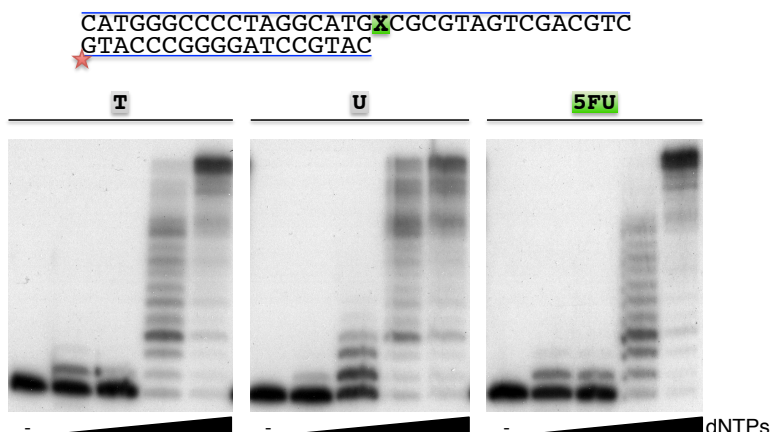


Figura 80. Síntesis a través de la lesión 5FU. Ensayo polimerasa sobre las estructuras molde/iniciador que se indican en la imagen con dT, U y 5FU como bases directoras de la primera inserción proporcionando todos los dNTPs (0.1, 1, 10 y 100 μ M).

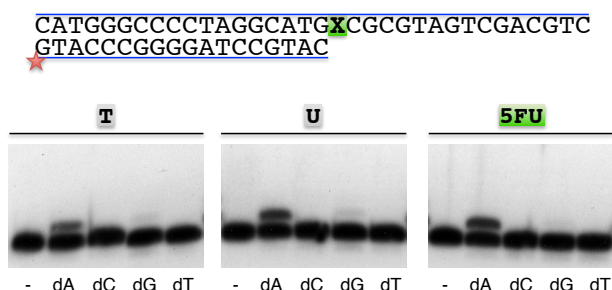


Figura 81. Inserción de cada dNTP frente a 5FU. Actividad polimerasa sobre una estructura molde/iniciador que contiene un 5FU, evaluando la inserción de cada dNTP (100 nM).

5.5 Síntesis a través de O⁶-metilguanina

Una de las modificaciones más comunes en el DNA es la formación de O⁶-metilguanina (6-meG) causada por varios agentes como el humo de tabaco, la metilnitrosourea y otros agentes alquilantes (Singer & Grunberger 1983). El grupo metilo de 6-meG es reconocido y eliminado por la enzima metilguanina metil transferasa (MGMT). Si esto no ocurre, 6-meG constituirá una lesión premutagénica, ya que aparea preferentemente con dT, debido al grupo metilo unido covalentemente al oxígeno 6 de la guanina ([Fig. 82](#)). Se ha descrito que varias polimerasas humanas insertan dT frente a 6-meG, favoreciendo las transiciones dG:dC a dA:dT (Haracska et al. 2002; Haracska et al. 2003; Picher & Blanco 2007).

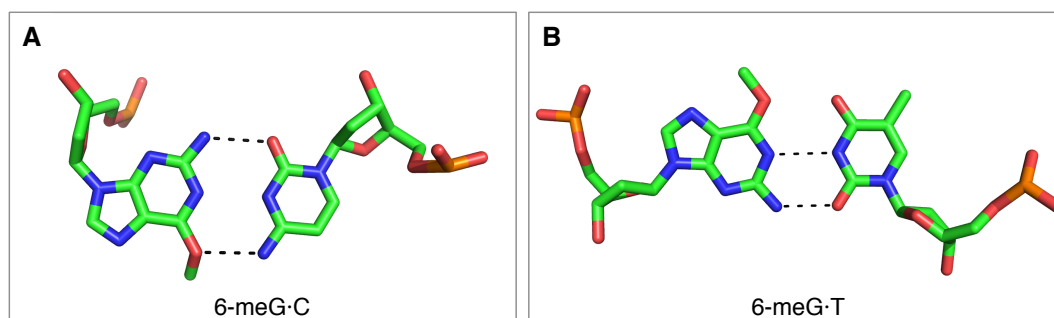


Figura 82. Estructuras de los posibles apareamientos de la base modificada 6-meG. A. Apareamiento de 6-meG con C (PDB:1D24). B. Apareamiento de 6-meG con T (PDB:1D27).

Se valoró la actividad DNA polimerasa de PrimPol empleando un molde/iniciador con la base 6-meG como primer nucleótido a copiar. En la [figura 83](#) se puede observar como PrimPol realiza la síntesis a través de la lesión 6-meG con la misma eficacia que sobre un molde equivalente, no dañado. Por otra parte, PrimPol copia la base dañada 6-meG insertando preferentemente dT, aunque de modo menos eficiente (10 veces) que la copia que realiza de dG en el molde control, no dañado ([Fig. 84](#)). En conclusión, si bien la participación de PrimPol en la tolerancia de esta lesión contribuiría a la mutagenicidad, ya que la inserción mas favorable de dT favorecería las transiciones dG:dC a dA:dT, la baja eficiencia de esta reacción sugeriría que PrimPol pudiese esquivar esta lesión, y continuar la elongación.

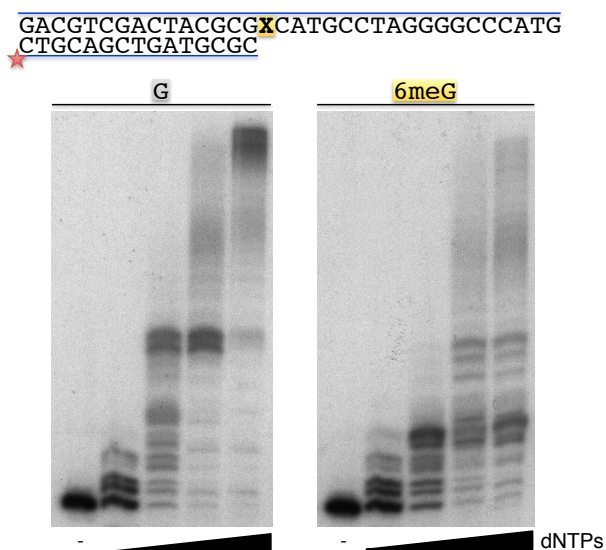


Figura 83. Síntesis a través de la lesión 6-meG. Ensayo polimerasa sobre un molde/iniciador que contiene el daño 6-meG utilizando concentraciones crecientes de dNTPs (0.1, 1, 10 y 100 μ M).

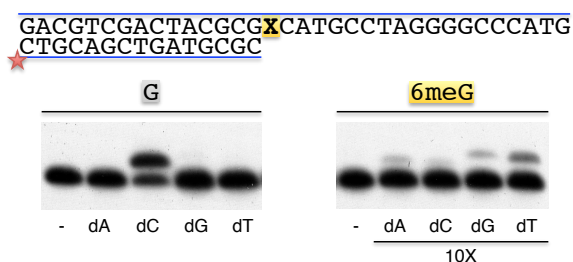


Figura 84. Inserción de cada dNTP frente a 6meG. Actividad polimerasa sobre una estructura molde/iniciador que contiene una base 6meG, ensayándose la inserción de cada dNTP (1 μ M). Como control se evaluó la inserción de cada dNTP (100 nM) frente al molde no dañado.

5.6 Síntesis a través de modificaciones de la citosina

La metilación de la base citosina es una modificación del DNA que se encuentra en muchos organismos eucariotas. La 5-metilcitosina (5-meC) es una marca epigenética estable que desempeña un papel importante durante el desarrollo y en la defensa del genoma frente a elementos transponibles (Yoder et al. 1997). La mayor parte de la metilación en el DNA animal se encuentra en las islas CpG cerca de los promotores de los genes y regula la expresión de los mismos (Bender 2004). La copia por parte de las polimerasas de esta base modificada es tan fiel como la que realizan sobre dC. Sin embargo, 5-meC puede sufrir desaminación y posterior oxidación inducida por radiación dando lugar a la 5-hidroximetil uracilo (5-HmeU) (Fig. 85) (Teebor et al. 1984), que puede aparear con dG y dA (Liu et al. 2003).

Por otra parte, la desaminación y oxidación de la citosina genera 5-hidroxiuracil (5-HU) (Fig. 85). Estas lesiones son frecuentemente observadas tras una exposición a radiación ionizante y son lesiones potencialmente mutagénicas ya que llevan a transiciones dC:dG a dT:dA (Wagner et al. 1992; Kreutzer & Essigmann 1998).

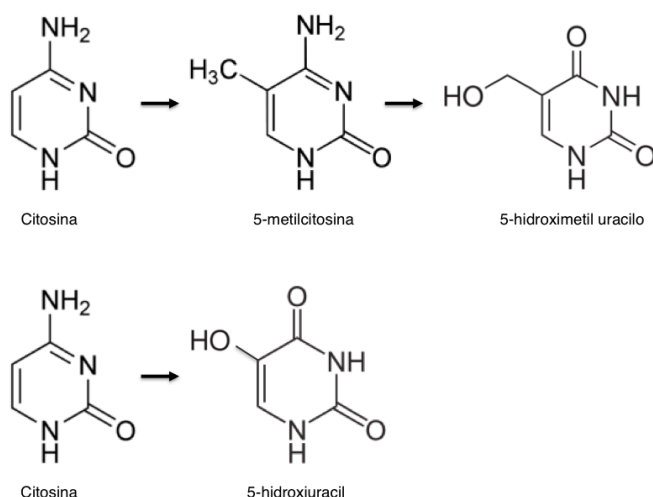


Figura 85. Modificaciones de la citosina. La base nitrogenada citosina es metilada dando lugar a 5-metilcitosina, esta puede sufrir desaminación y oxidación dando 5-hidroximetil uracilo. La citosina puede desaminarse y oxidarse a 5-hidroxiuracilo.

Se realizaron ensayos de síntesis a través de estas lesiones, presentes como primera posición del DNA molde. En el caso del 5-meC, PrimPol sintetiza a través de la base modificada insertando dG con la misma eficiencia que frente a una C normal (Fig. 86 paneles superiores). La síntesis a través del 5-HmeC es realizada de forma fiel insertando dA, de modo que no contribuye al carácter mutagénico de esta lesión (Fig. 86 panel inferior central). Finalmente, PrimPol no es capaz de copiar la base dañada 5-HU lo que provoca un bloqueo de la síntesis sobre un sustrato molde que contiene la lesión (Fig. 86 panel inferior derecho).

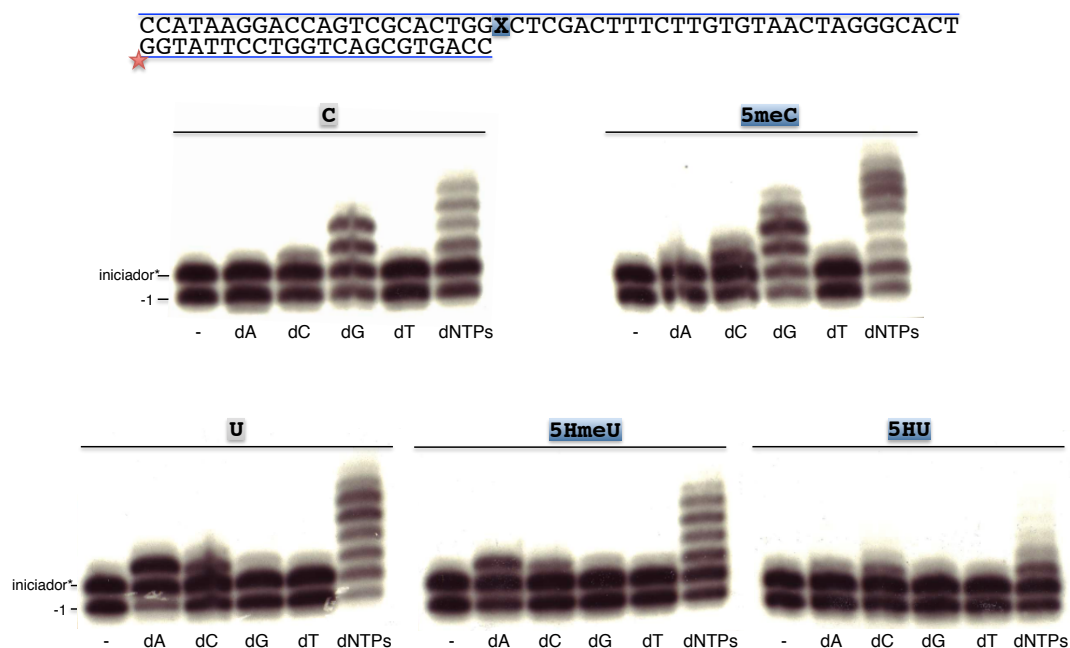


Figura 86. Copia y extensión de las bases modificadas 5meC, 5HmeU y 5HU. Ensayo polimerasa sobre una estructura molde/iniciador que contiene las bases 5meC, 5HmeU, 5HU, y C o U como control, utilizando cada dNTP (100 nM) o los cuatro dNTPs (100 nM) para evaluar su extensión.

5.7 Requerimiento de manganeso para la translesión

Se ha demostrado la capacidad de PrimPol de realizar síntesis a través de varios daños comunes en el DNA. En general, tanto para su actividad primasa, como DNA polimerasa, PrimPol prefiere utilizar iones manganeso como cofactor. Nos planteamos estudiar con mas detalle la dependencia de Mn^{2+} durante las reacciones de síntesis translesión (concretamente con las lesiones 8oxoG, sitio abásico y dímero de timinas) utilizando sustratos de tipo molde/iniciador donde el daño se encuentra a una distancia de tres nucleótidos desde el extremo del iniciador. Para ello, se valoró la actividad de PrimPol en un rango de concentración de $MnCl_2$ desde 0.01 a 5 mM.

En el caso del daño 8oxoG, PrimPol fue eficiente desde concentraciones de Mn^{2+} tan bajas como 50 μM (Fig. 87A), enfatizando de nuevo la especialización de PrimPol para tolerar este tipo de daño. Por otro lado, para la translesión del sitio abásico o el CPD PrimPol requiere una mayor concentración de Mn^{2+} , al menos 200 μM para el sitio abásico (Fig. 87B) y 500 μM para el dímero de timinas tipo CDP (Fig. 87C); lo que plantearía que quizás la translesión de estas lesiones sería poco eficiente en condiciones *in vivo*. Sin embargo, se han descrito altas concentraciones de Mn^{2+} en la célula como respuesta al daño oxidativo, y se conoce el papel que tiene dicho metal en la adaptación celular al estrés oxidativo (Aguirre & Culotta 2012).

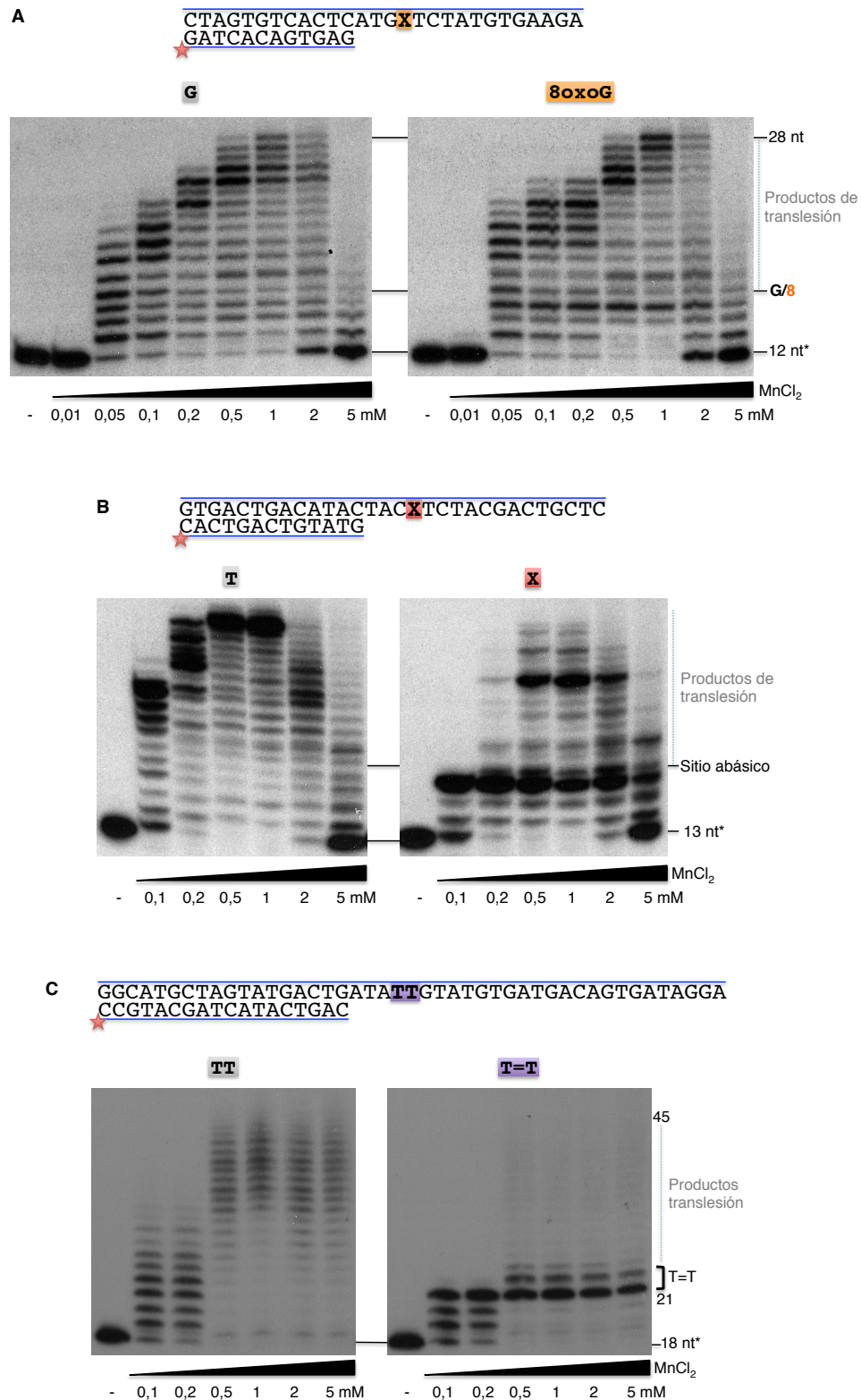


Figura 87. Translesión de daños dependiente de manganeso. A. Síntesis a través de la lesión 8oxoG en el molde usando dNTPs (10 μ M) y las concentraciones indicadas de MnCl₂. **B.** Síntesis a través de un sitio abásico con dNTPs (10 μ M) y diferentes concentraciones de MnCl₂. **C.** Paso del dímero de timinas con dNTPs (10 μ M) y las concentraciones de MnCl₂ indicadas.

6

***Función del dominio de unión a zinc
en PrimPol***

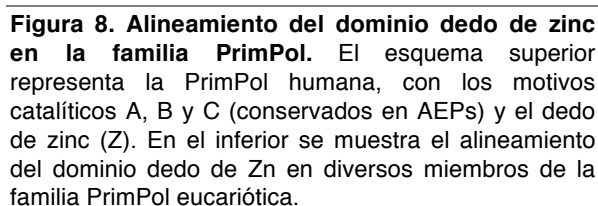
6.1 PrimPol posee un posible dominio de unión a zinc

PrimPol contiene lo que potencialmente parece un dominio dedo de zinc del tipo Cys-His-Cys-Cys en su extremo C-terminal, el cual está altamente conservado en primasas virales, procarióticas y eucarióticas. El dominio dedo de zinc se define como un motivo estructural que contiene varias protuberancias de tipo dedo, las cuales establecen contactos con otras moléculas. Este motivo se caracteriza por unir uno o más iones metálicos, generalmente zinc, con la finalidad de estabilizar la estructura de la proteína que los contiene. Estos dominios pueden estar involucrados en unión a secuencias específicas de DNA, interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-lípido, así como en el mantenimiento de la homeostasis del zinc, y en la integridad estructural de proteínas. En el caso de las primasas, la localización dentro de la secuencia proteica de este dedo de zinc es típico de cada clado. Así, las primasas bacterianas y de algunos bacteriófagos (tipo DnaG) presentan este dominio en el extremo N-terminal de la proteína; las primasas de eucariotas y arqueas (tipo subunidad pequeña, PriS) lo tienen en la parte central de su secuencia proteica, y las primasas de grandes virus nucleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDV), primasas de herpesvirus y las PrimPols presentan el dedo de zinc en el extremo C-terminal de la proteína (Tabla 8). Hay que destacar que las primasas AEP tipo LigD bacterianas, dedicadas al proceso de reparación por reunión de extremos no homólogos (NHEJ), no presentan ningún dominio dedo de zinc en su secuencia. Además, estas AEPs perdieron su capacidad de sintetizar iniciadores, siendo capaces solo de insertar unos pocos nucleótidos en el extremo 3' de una rotura de doble cadena (Pitcher et al. 2007).

Primasa	Secuencia de unión a zinc	aa dedo zinc/ aa totales
Bacteriófagos		
T7 gp4	Cys-X ₂ -Cys-X ₁₅ -Cys-X ₂ -Cys	15-37/567
T4 gp61	Cys-X ₂ -Cys-X ₂₄ -Cys-X ₂ -Cys	37-68/342
Procariotas		
<i>E. coli</i> DnaG	Cys-X ₂ -His-X ₁₇ -Cys-X ₂ -Cys	40-64/580
<i>B. subtilis</i> DnaG	Cys-X ₂ -His-X ₁₇ -Cys-X ₂ -Cys	38-63/602
Virus		
HSV-UL52	Cys-X ₄ -His-X ₂₉ -Cys-X ₄ -Cys	988-1028/1058
Varicella zoster virus gen 6	Cys-X ₄ -His-X ₂₈ -Cys-X ₄ -Cys	1022-1061/1083
Eucariotas		
<i>S. cerevisiae</i> PRI1	Cys-Cys-X ₅ -Cys-X ₂ -Cys	123-373/409
<i>M. musculus</i> PRIM1	Cys-Cys-X ₅ -Cys-X ₂ -Cys	121-131/417
<i>H. sapiens</i> PrimPol	Cys-X ₅ -His-X ₁₉ -Cys-X ₄ -Cys	419-451/560
Arqueas		
<i>S. islandicus</i> pRN1 dominio PrimPol	His-X ₄₆ -His-X ₂ -Cys-X ₄ -Cys	141-196/370

Tabla 8. Sitios potenciales de unión a Zn en primasas. Se indica el origen y el nombre de la proteína, la secuencia proteica que coordina el Zn (donde X es cualquier aminoácido), y la localización de dichos residuos en relación a los totales de la proteína.

Este dominio de unión a zinc está conservado en toda la familia de secuencias de la proteína PrimPol humana, como puede observarse en el alineamiento de la figura 88. Este dominio dedo de zinc se localiza en el extremo C-terminal de la proteína conservándose los residuos críticos para la coordinación del átomo de zinc: una histidina y tres cisteínas.

[illegible]

130

6.1.1 Mutagénesis dirigida del dominio dedo de zinc

Para conocer la implicación del dominio de unión a zinc en las actividades enzimáticas de PrimPol se llevó a cabo mutagénesis dirigida en los residuos críticos. Como se describe en Materiales y Métodos, se obtuvieron dos variantes con mutaciones puntuales en los residuos encargados de coordinar el átomo de zinc, Cys⁴¹⁹, His⁴²⁶, Cys⁴⁴⁶ y Cys⁴⁵¹; estos mutantes se denominaron: CH: [C419G, H426Y] y CC: [C446G, C451G]. Además, se diseñó un mutante de delección que carece del dominio completo (1-409 aa) al que se denominó Δ Zn, y sobre éste se realizó la versión catalíticamente inactiva Δ ZnAxA.

6.2 Implicación del dedo de zinc en la actividad primasa de PrimPol

Los dedos de zinc están implicados en el reconocimiento específico de secuencia en el DNA en muchas proteínas, incluidos los factores de transcripción y nucleasas (Pavletich & Pabo 1993; Durai et al. 2005). Se ha caracterizado previamente la implicación de dicho dominio en el reconocimiento de secuencia por parte de las primasas de los bacteriófagos T7 y T4 (Kusakabe & Richardson 1996), mientras que en la primasa (UL52) del virus HSV1 (que es una AEP) se ha implicado además directamente en la actividad catalítica (Biswas & Weller 1999; Chen et al. 2007).

Se evaluó la actividad primasa de los mutantes de PrimPol sobre M13cs, y usando dNTPs. Como se observa en la [figura 90](#) todas las versiones mutadas de PrimPol: Δ Zn, CH y CC tienen gravemente reducida su capacidad de sintetizar (y elongar) iniciadores sobre un molde de DNA heterogéneo usando dNTPs.

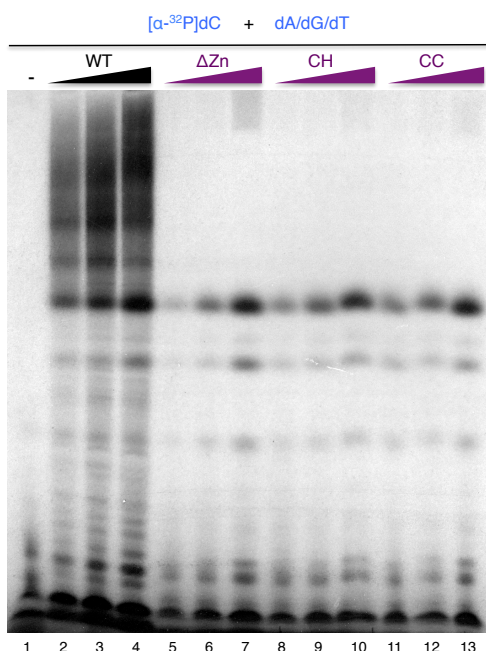


Figura 90. Ensayo primasa sobre el molde M13cs de las proteínas WT, Δ Zn, CH y CC. Se llevó a cabo un ensayo primasa sobre M13cs empleando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (16 nM) y dATP, dGTP y dTTP (100 μM), y concentraciones crecientes de PrimPol WT y de sus derivados mutantes (100 nM, 200 nM y 400 nM).

Para estudiar la reacción de iniciación de forma mas específica se empleó el oligo Gtcc $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dGTP (10 μM), lo que permite evaluar los primeros productos de síntesis ([Fig. 91](#)). Los mutantes en el dedo de Zn fueron muy poco activos en comparación con PrimPol WT, solo observándose algunos productos de iniciación cuando se utilizó una elevada concentración de dichos mutantes. Por tanto, podemos concluir que el dominio dedo de Zn de PrimPol interviene en la formación del iniciador afectando severamente la formación del dinucleótido, que es el paso limitante de la reacción..

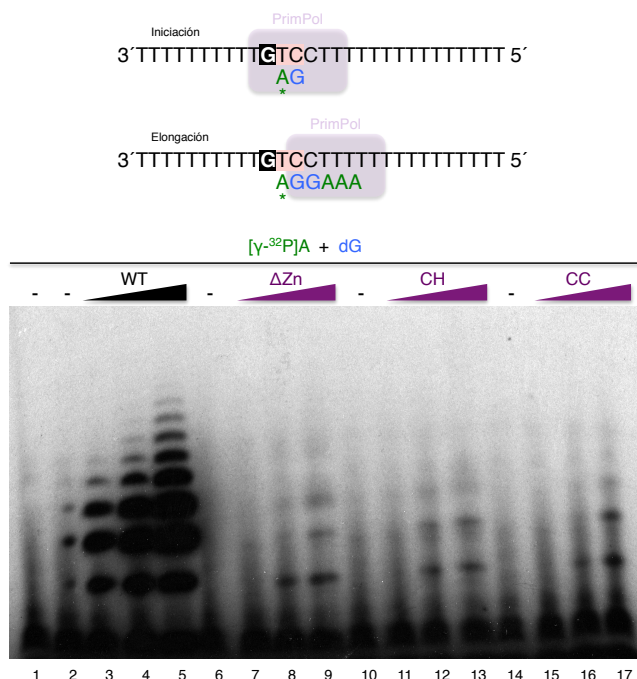


Figura 91. Ensayo primasa sobre el molde Gtcc de las proteínas PrimPol WT, y de los mutantes Δ Zn, CH y CC. Se llevó a cabo un ensayo primasa sobre el oligo Gtcc empleando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dGTP (10 μM), y concentraciones crecientes de las proteínas (100 nM, 200 nM y 400 nM).

Dado que la actividad primasa de los mutantes en el dedo de Zn sobre el sustrato Gtcc es poco eficiente se cuestionó si la ausencia de este dominio podría provocar un cambio estructural en la proteína que impidiese el reconocimiento específico de la G en el molde como nucleótido críptico. Para averiguarlo se ensayó PrimPol WT y Δ Zn en un ensayo primasa sobre los moldes Atcc, Ctcc, Gtcc y Ttcc (Fig. 92) en los que el nucleótido críptico (que es reconocido, pero no copiado) se presenta en sus cuatro posibilidades. En este ensayo no se detectó el mismo nivel de actividad primasa previamente observada con Δ Zn sobre el oligo Gtcc (carril 11), lo que pudo deberse a la baja concentración de dGTP (1 μM) utilizada en este ensayo en comparación con el anterior (10 μM). Sin embargo, y a pesar de un fondo de marcaje inespecífico en ausencia de molde (ver carril 8), se detectó la formación de iniciadores sintetizados por el mutante PrimPol Δ Zn sobre los 4 oligos analizados (indicados con un asterisco en los carriles 9 a 12), pero sin existir ninguna ventaja en el caso del oligo Gtcc. Aunque la eficiencia de la síntesis de estos iniciadores es muy reducida, está al mismo nivel que la producida por PrimPol WT sobre los moldes Atcc, Ctcc y Ttcc (los tres carentes del nucleótido críptico). Por tanto, parece que la ausencia del dominio dedo de zinc en PrimPol ha supuesto la pérdida selectiva del reconocimiento de la G en la secuencia preferida para iniciar la síntesis.

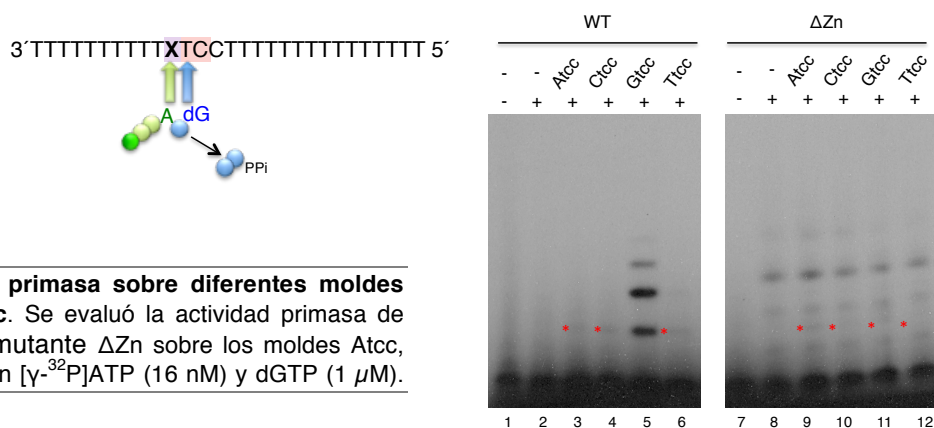


Figura 92. Ensayo primasa sobre diferentes moldes derivados del Gtcc. Se evaluó la actividad primasa de PrimPol WT y del mutante Δ Zn sobre los moldes Atcc, Ctcc, Gtcc y Ttcc con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM) y dGTP (1 μM).

Se ha descrito que la mutación del dedo de zinc en la primasa UL52 de HSV1 afecta severamente a la unión de la proteína al DNA (Biswas & Weller 1999). Por ello, se evaluó la capacidad de unión a DNA de PrimPol Δ Zn frente a PrimPol WT usando los moldes Gtcc (Fig. 93A) y Atcc (Fig. 93B), mediante un ensayo de retardo en gel. Ambas versiones, WT y Δ Zn de PrimPol presentaron una similar capacidad de formar el complejo DNA-proteína por lo que parece que el dominio dedo de zinc no es esencial para la unión de la cadena molde de DNA por PrimPol.

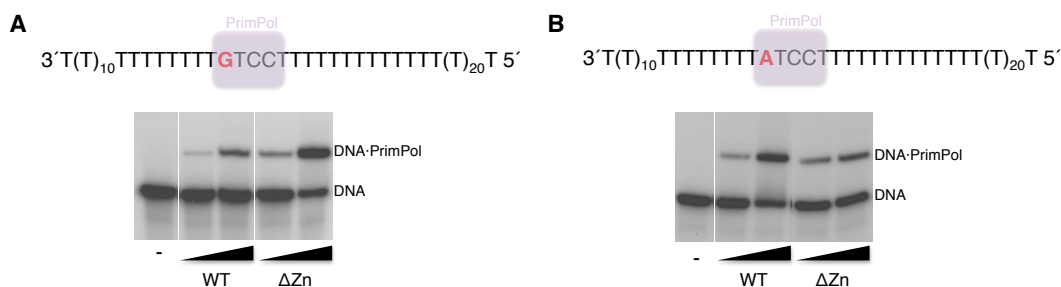


Figura 93. Ensayo de retraso en gel de PrimPol WT y Δ Zn. Se evaluaron diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 20 y 40 nM) de ambas proteínas en cuanto a su unión a los moldes Gtcc y Atcc (de tamaño largo) marcados en 5' con [γ - 32 P]ATP.

Puesto que la versión Δ Zn de PrimPol mostró una disminuida capacidad de sintetizar iniciadores se llevaron a cabo una serie de experimentos sobre el molde Gtcc para averiguar la naturaleza de los productos que podría llegar a sintetizar. En un primer ensayo se mantuvo constante y limitante el primer nucleótido necesario (ATP o dATP), que se proporcionó marcado radiativamente, y se aumentó la concentración del segundo (dGTP) (Fig. 94A). PrimPol Δ Zn solo pudo formar una pequeña cantidad del dinucleótido, incluso a la mayor concentración de dGTP. De forma paralela se llevó a cabo un experimento donde se aumentó progresivamente la concentración del primer nucleótido necesario, ATP o dATP, utilizando dGTP marcado radiativamente y a una concentración constante y limitante (Fig. 94B). Mientras que PrimPol WT generó una cantidad de dinucleótido proporcional a la concentración de ATP o dATP (nucleótido en 5') suministrada, PrimPol Δ Zn solo fue capaz de formar una baja cantidad de dinucleótido, usando la concentración mas alta de ATP, pero no con dATP. Estos resultados con el mutante PrimPol Δ Zn sugieren que, en condiciones no idóneas, la actividad primasa de PrimPol tiene preferencia por los NTPs frente a los dNTPs en el sitio 5' durante la formación del dinucleótido.

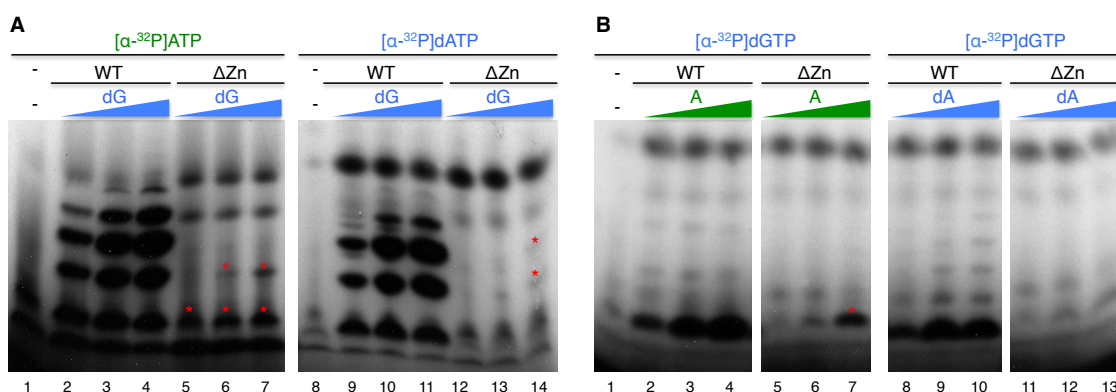


Figura 94. Importancia del dedo de zinc para la actividad primasa: comparación de NTPs y dNTPs para el sitio 5' del iniciador. A. Ensayo primasa comparando WT y Δ Zn sobre el molde Gtcc empleando [α - 32 P]ATP o [α - 32 P]dATP (16 nM) como nucleótido para el sitio 5' y dGTP (1, 10 y 100 μ M) para la posición 3' del iniciador. B. Ensayo de las proteínas WT y Δ Zn sobre el molde Gtcc proporcionando cantidades crecientes de ATP o dATP (1, 10 y 100 μ M) y una concentración constante de [α - 32 P]dGTP (16 nM). Se señala con asteriscos rojos las reacciones positivas de PrimPol Δ Zn.

Del mismo modo se realizó el estudio de la entrada de un ribo o un deoxi en el sitio 3' de la proteína PrimPol Δ Zn en la formación del dinucleótido. Como se puede observar en la [figura 95](#), la proteína WT sintetizó iniciadores de forma poco eficiente usando GTP, y una mayor cantidad de iniciadores usando dGTP, como segundo nucleótido. Esta estimulación debida al uso de dNTPs en la posición 3' del iniciador se mantuvo en la proteína mutada PrimPol Δ Zn.

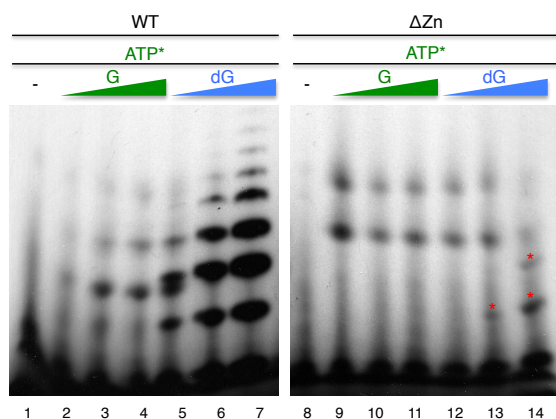


Figura 95. Importancia del dedo de zinc para la actividad primasa: comparando NTPs y dNTPs para el sitio 3' del iniciador. Ensayo primasa usando WT y Δ Zn sobre el molde Gtcc empleando [α - 32 P]ATP (16 nM) como nucleótido para el sitio 5' y GTP o dGTP (1, 10 y 100 μ M) para la posición 3' del iniciador. Se señala con asteriscos rojos las reacciones positivas de PrimPol Δ Zn.

Por tanto, la ausencia del dominio dedo de zinc en PrimPol disminuyó drásticamente la eficiencia de formación de los iniciadores, quedando condicionada su síntesis al uso de un ribonucleótido en la posición 5' y un desoxirribonucleótido para la posición 3' del iniciador sintetizado.

Como se ha descrito en el capítulo 2, la actividad primasa de PrimPol se ve favorecida cuando se usa una combinación de NTPs (purinas) y dNTPs, de modo que se pueden emplear los ribonucleótidos de purinas para inducir un aumento de iniciaciones, usándolos como nucleótido 5' del iniciador, mientras que los desoxirribonucleótidos son los sustratos favoritos para la elongación. Ya que la ausencia del dominio dedo de zinc en PrimPol permite la formación de una pequeña proporción de iniciadores, se pensó en maximizar estas iniciaciones para poder comprobar si la ausencia del dominio tiene algún efecto en la fase de elongación. Para ello se utilizó el molde Gtcc, los nucleótidos [α - 32 P]ATP y dGTP y se añadieron concentraciones crecientes de ATP para promover una mejor detección de los productos de elongación ([Fig. 96](#)).

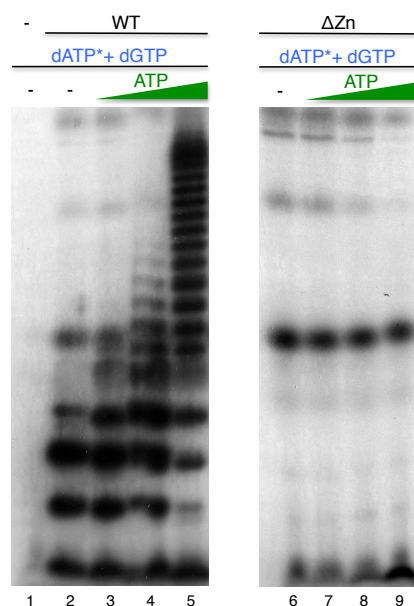


Figura 96. Análisis de la fase de elongación tras la iniciación sobre el molde Gtcc. Se realizó un ensayo de primasa y polimerasa acoplado usando el molde Gtcc aumentando las cantidades de ATP (10 μ M, 100 μ M y 1 mM) y manteniendo constantes [α - 32 P]dATP y dGTP (10 μ M).

Como puede observarse en la [figura 96](#) mientras que la proteína WT es capaz de sintetizar iniciadores y extenderlos, PrimPol Δ Zn, aunque sabemos que puede formar una cantidad detectable de di o trinucleótidos del tipo pppA-dG-dG (no marcados en estas condiciones), no fue capaz de extenderlos. Por tanto parece que la ausencia del dominio dedo de zinc en PrimPol también impide la etapa de extensión del iniciador, lo que se denomina fase de transición entre la iniciación y la elongación.

Se ha demostrado que el dominio dedo de zinc es responsable en su mayoría, pero no en exclusiva, del reconocimiento específico de secuencia para la iniciación en las primasas de los bacteriófagos T4, T7 y la primasa de herpesvirus UL52 (Kusakabe & Richardson 1996). Nos planteamos averiguar si la preferencia de PrimPol por determinadas secuencias para iniciar la síntesis podría depender del dominio dedo de zinc, y por tanto cambiaría si este no está presente o se encuentra desestabilizado. Para ello se realizó un estudio similar al llevado a cabo con la proteína PrimPol WT en el que se evalúa la síntesis de dinucleótidos con distintos pares de nucleótidos, y a partir de los resultados se deduce los sitio favoritos de iniciación. El estudio de la iniciación sobre el molde heterogéneo M13cs se realizó con cada proteína WT, Δ Zn, CH y CC y con las combinaciones de dos nucleótidos: dNTP+dNTP o dNTP+NTP usando dGTP o dCTP marcado radiativamente en [α^{32} P]; de ese modo se obtuvieron 16 combinaciones por proteína. En la [figura 97](#) se esquematizan los resultados obtenidos con las proteínas WT y Δ Zn, utilizando una tabla tipo matriz para cada proteína. Se indica en la primera columna los dNTPs (azul) que se combinan con los marcados (indicados en la cabecera) de la primera fila y de forma similar la combinación de estos con los NTPs (verde) de la última columna. El nivel de actividad primasa obtenido se indica con uno o varios signos +.

WT					
		dC*	dG*	dC*	dG*
dA	+	+++		+++	A
dC			+	+	C
dG	+++	++	+++	+++	G
dT		+		+	U

Δ Zn					
		dC*	dG*	dC*	dG*
dA				++	A
dC					C
dG	+	+	+++	+++	G
dT			+		U

Figura 97. Dinucleótidos sobre M13 formados por PrimPol WT y el mutante PrimPol Δ Zn. Ensayo primasa sobre M13cs utilizando combinaciones de dos nucleótidos: [α^{32} P]dCTP o [α^{32} P]dGTP (16 nM) y cada dNTP o NTP (10 μ M). Se indica con uno o varios signos + la intensidad con la que PrimPol WT o el mutante Δ Zn forman el dinucleótido.

Como se mostró anteriormente el mutante PrimPol Δ Zn posee menor eficiencia de síntesis de los iniciadores sobre el molde M13cs. Los dinucleótidos que se detectan, sintetizados por el mutante Δ Zn, se dan mayoritariamente en presencia de un NTP. De modo congruente con lo observado cuando se empleó el molde Gtcc, la presencia de un NTP ayuda a la formación del dinucleótido en la proteína PrimPol Δ Zn seguramente debido a la estabilización de la unión a este nucleótido a través de contactos entre PrimPol y el grupo 2'OH de los NTPs. Por otra parte, este estudio más detallado de los dinucleótidos preferentemente sintetizados por el mutante PrimPol Δ Zn revela la misma preferencia que PrimPol WT, para utilizar purinas durante la iniciación (combinaciones A+dG, G+dG y G+dC en [Fig. 97](#) panel derecho).

Por tanto el dominio dedo de zinc parece estar involucrado en el posicionamiento correcto de los sustratos requeridos para la síntesis *de novo* de un iniciador: el DNA molde y los dos nucleótidos (independiente de su base), que como ya se ha demostrado, es el paso limitante de la actividad primasa.

6.3 Implicación del dedo de zinc en la actividad polimerasa de PrimPol

Se evaluó el papel del dominio dedo de zinc de PrimPol en la actividad polimerasa de la proteína. Se ensayaron concentraciones crecientes de las proteínas mutadas frente a la proteína PrimPol WT sobre una estructura de DNA del tipo molde/iniciador (Fig. 98). En el panel A de la figura 85 se observó un patrón de polimerización mucho más avanzado en el mutante PrimPol Δ Zn que en la proteína WT. Para corroborar que la actividad observada es intrínseca a la falta del dominio dedo de Zn, y no a una actividad contaminante que pudiera ser arrastrada durante la purificación de esta variante de PrimPol, se ensayó en paralelo el mutante PrimPol Δ Zn/AxA. La falta de actividad DNA polimerasa del mutante PrimPol Δ Zn/AxA, debida a la destrucción del sitio activo, descarta la presencia de un contaminante, y demuestra por tanto que la actividad de polimerización mas elevada es intrínseca al mutante PrimPol Δ Zn. Por el contrario, los mutantes puntuales en el dominio dedo de zinc de PrimPol (CH y CC), mostraron una actividad polimerasa similar a la WT (Fig. 98B).

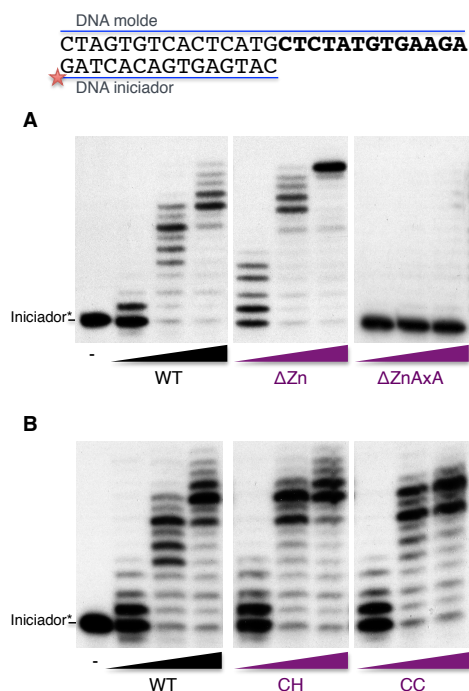


Figura 98. Actividad polimerasa de las proteínas mutadas en el dominio dedo de zinc en comparación con la versión WT. **A.** Ensayo DNA polimerasa sobre una estructura de tipo molde/iniciador de DNA empleando dNTPs (10 μ M) y concentraciones crecientes de las proteínas WT, Δ Zn y Δ ZnAxA (50, 100 y 200 nM). **B.** Ensayo DNA polimerasa llevado a cabo con concentraciones crecientes de las proteínas WT, CH y CC (50, 100 y 200 nM).

Para averiguar si las características como polimerasa de PrimPol Δ Zn son similares a las de la PrimPol WT se ensayó su capacidad de polimerizar usando iniciadores pre-existentes de DNA y RNA, y utilizando tanto dNTPs como NTPs (Fig. 99). PrimPol Δ Zn mantuvo las mismas peculiaridades como polimerasa, necesitando en todos los casos una concentración de nucleótidos 100 veces menor para alcanzar niveles de síntesis similares a PrimPol WT.

Por tanto, el dedo de zinc no es responsable del reconocimiento de la estructura tipo molde/iniciador, ya esté formada por un iniciador de DNA o RNA. Igualmente, este dominio no es necesario para la eficiente utilización de los sustratos nucleotídicos (NTPs o dNTPs). Por el contrario, su ausencia parece beneficiosa para algún aspecto de la reacción de polimerización.

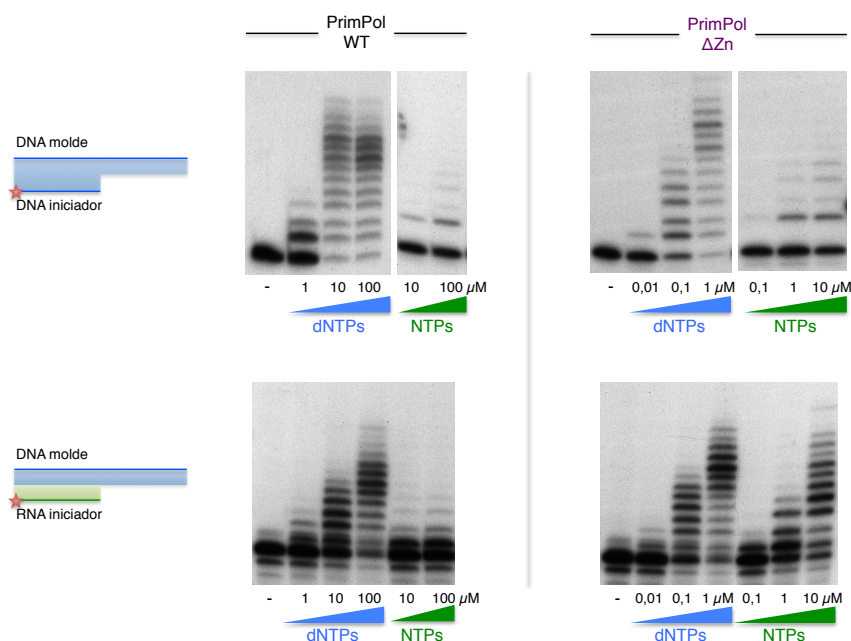


Figura 99. PrimPol Δ Zn tiene una actividad polimerasa incrementada, tanto sobre iniciadores de DNA como de RNA, ya sea insertando dNTPs o NTPs. Actividad polimerasa de PrimPol WT o Δ Zn (200 nM) sobre un sustrato de molde/iniciador DNA/DNA (paneles superiores) extendido con dNTPs o NTPs a las concentraciones indicadas. Actividad polimerasa sobre un sustrato de molde/iniciador DNA/RNA (paneles inferiores) extendido con dNTPs o NTPs a las concentraciones que se muestran.

Con la finalidad de comprobar si PrimPol Δ Zn es capaz de realizar la copia fiel del molde de DNA se llevó a cabo un estudio de incorporación de cada dNTP frente a las cuatro posibles bases molde tal y como se representa en la [figura 100A](#).

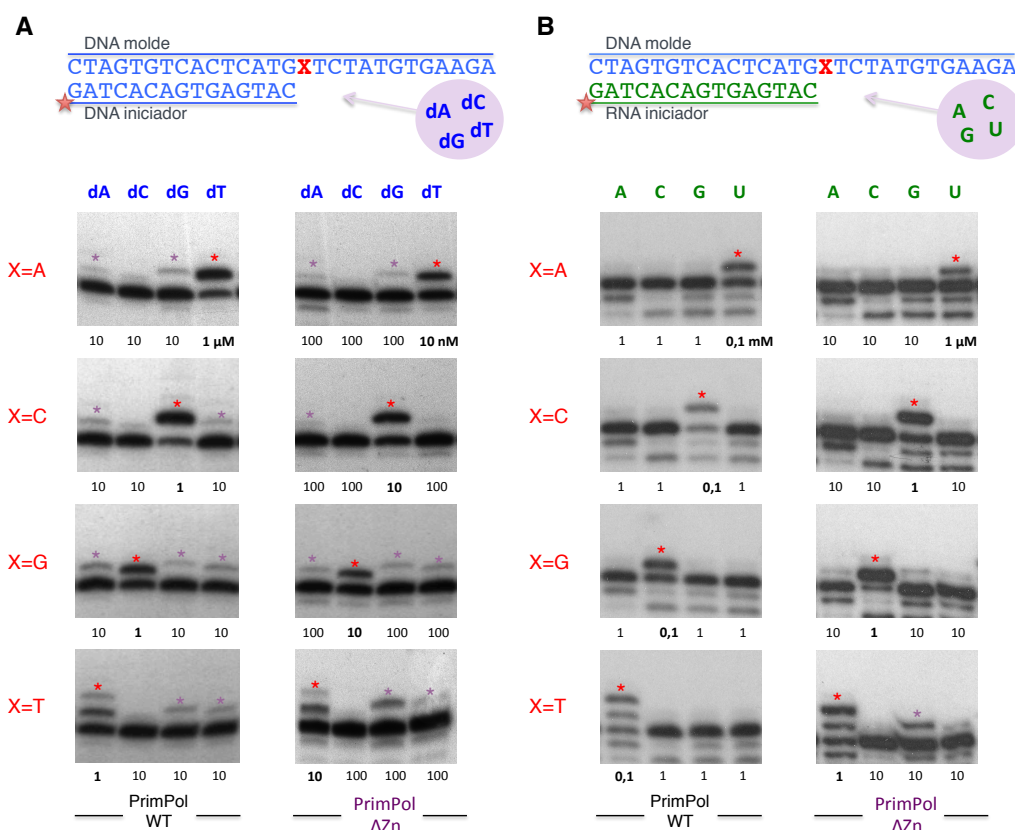


Figura 100. Fidelidad de PrimPol Δ Zn en comparación con la versión WT. A. Inserción frente a las cuatro bases en el molde realizada sobre una estructura molde/iniciador de DNA donde se proporciona cada desoxirribonucleótido correcto y los incorrectos a una concentración 10 veces mayor para ambas proteínas. **B.** Inserción frente a las cuatro bases en el molde de DNA empleando un iniciador de RNA y los ribonucleótidos correctos e incorrectos (10x).

Para PrimPol WT (como control) se usó una concentración de 1 μ M para el nucleótido correcto y 10 μ M para los incorrectos, mientras que para PrimPol Δ Zn se usaron unas concentraciones 100 veces menores (10 nM para el correcto y 100 nM para los incorrectos). Dada la capacidad de PrimPol para actuar como RNA polimerasa, extendiendo un iniciador de RNA con NTPs, se llevó a cabo también el experimento de fidelidad en estas condiciones (Fig. 100B). El patrón de inserción de errores, la “huella de errores” de polimerización, fue muy similar para ambas proteínas, tanto cuando esta actúa como DNA o como RNA polimerasa.

6.3.1 Análisis de la afinidad de PrimPol Δ Zn por dNTPs

Dado que el patrón de polimerización por parte de PrimPol Δ Zn fue distributivo, igual que el de la PrimPol WT, y que no se vio afectada la capacidad de unión de la proteína mutada al DNA, se quiso evaluar la afinidad de PrimPol Δ Zn por los dNTPs durante una reacción de DNA polimerasa. Para ello se realizaron medidas cinéticas de polimerización en condiciones de estado estacionario (ver Materiales y Métodos). Se midió la incorporación de cada uno de los cuatro dNTPs sobre una estructura de DNA de tipo molde/iniciador. Los resultados obtenidos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, y se emplearon para determinar los valores cinéticos que definen la actividad enzimática del mutante PrimPol Δ Zn y se compararon con los propios de la PrimPol WT (Tabla 9). El valor de K_M aparente para los dNTPs de PrimPol Δ Zn está entre 20 y 80 nM (en función de cada dNTP), un valor que es aproximadamente 100 veces inferior a la K_M de la PrimPol WT, y que concuerda con lo anteriormente observado: la necesidad de una concentración de nucleótidos 100 veces inferior para PrimPol Δ Zn que para PrimPol WT para alcanzar los mismos niveles de polimerización.

Sustrato	Proteína	K_M (μ M)	K_{cat} (min^{-1})	Eficiencia K_{cat}/K_M	$K_M \Delta Zn / K_M WT$
dATP	WT	3	0.06	0.02	23
	ΔZn	0.08	0.04	0.46	
dCTP	WT	4	0.04	0.01	51
	ΔZn	0.06	0.03	0.51	
dGTP	WT	2.5	0.05	0.02	61
	ΔZn	0.04	0.05	1.22	
dTTP	WT	4	0.04	0.01	149
	ΔZn	0.02	0.03	1.49	

Tabla 9. Parámetros cinéticos de PrimPol Δ Zn y comparación con los obtenidos para PrimPol WT. Se indican las constantes K_M y k_{cat} y la eficiencia catalítica de cada enzima para la inserción de cada desoxirribonucleótido en una estructura molde/iniciador y se muestra en la última columna la relación de los valores de K_M entre la proteína WT y la variante ΔZn .

Estos resultados sugieren que la ausencia del dominio dedo de Zn mejora la afinidad por los dNTPs, quizás indirectamente por facilitar los ciclos de translocación del enzima, o por un efecto beneficioso sobre la formación del complejo ternario.

6.3.2 PrimPol Δ Zn en síntesis translesión

De los resultados obtenidos hasta ahora se puede deducir que la presencia del dominio estructural dedo de zinc en PrimPol es esencial para la actividad primasa pero no para la polimerización sobre un iniciador ya existente. Esta conclusión pone de manifiesto la dificultad añadida que supone empezar la síntesis *de novo* para la que seguramente resulta crucial la estabilización de todos los componentes necesarios, mediada por el dedo de zinc. Otra de las funciones más difíciles atribuidas a PrimPol, junto con la actividad primasa, es la síntesis a través de daños. Quisimos saber si el dominio dedo de zinc está implicado en el reconocimiento y/o síntesis a través de esas lesiones.

Para ello, se evaluó la translesión de la base oxidada 8oxoG en el molde, empleando una molécula molde/iniciador en la que el extremo 3' del iniciador se sitúa a tres nucleótidos de distancia de la base dañada, y se comparó el paso por el daño de PrimPol Δ Zn versus PrimPol WT (Fig. 101). Ambas proteínas sintetizaron a través de la base oxidada 8oxoG en el molde, de modo similar a la síntesis a través de un molde control, siendo el mutante PrimPol Δ Zn más eficiente ya que requiere menor concentración de dNTPs.

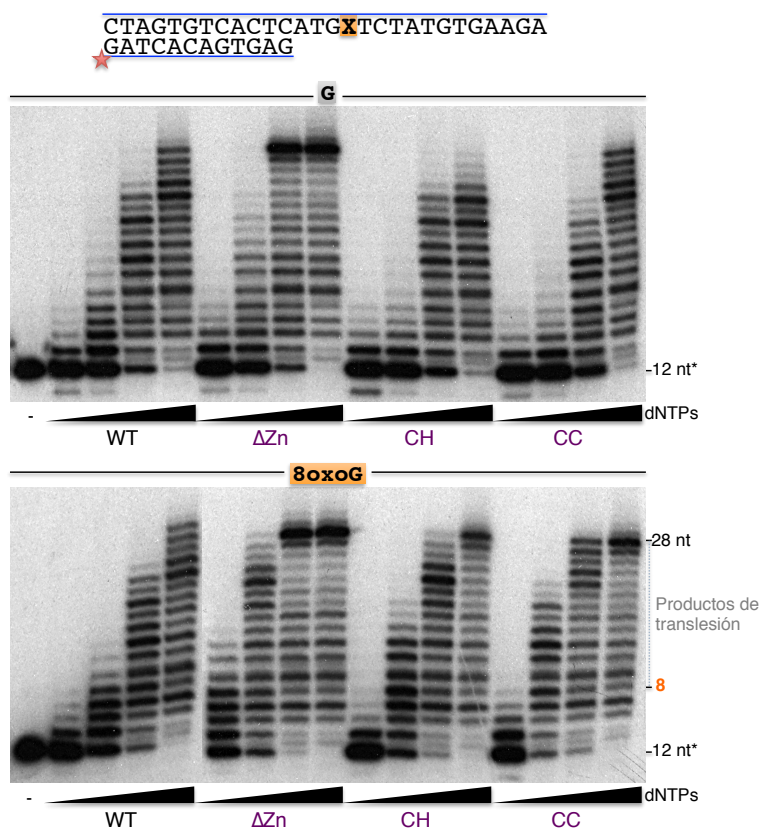


Figura 101. Síntesis a través de la lesión 8oxoG en el molde por parte de las proteínas mutadas en el dominio dedo de zinc. Ensayo polimerasa usando las proteínas WT, Δ Zn, CH y CC (200 nM) sobre un molde/iniciador que contiene una G normal (panel superior) o una 8oxoG (panel inferior) a tres nt de distancia del extremo 3' del iniciador, y concentraciones crecientes de dNTPs (0.1 , 1, 10 y 100 μ M).

Los mutantes puntuales, PrimPolCH y PrimPolCC fueron capaces de sintetizar a través de la lesión 8oxoG con un nivel de polimerización similar al WT (Fig. 101).

Como ya se ha demostrado anteriormente PrimPol fue capaz de copiar la base 8oxoG insertando tanto dCTP como dATP, de manera que también se estudió el tipo de copia que realiza el mutante PrimPol Δ Zn. Como puede verse en la figura 102 la inserción de dC o dA frente al 8oxoG no ha cambiado para la proteína Δ Zn, conservando la misma proporción de inserción dC/dA que la WT.

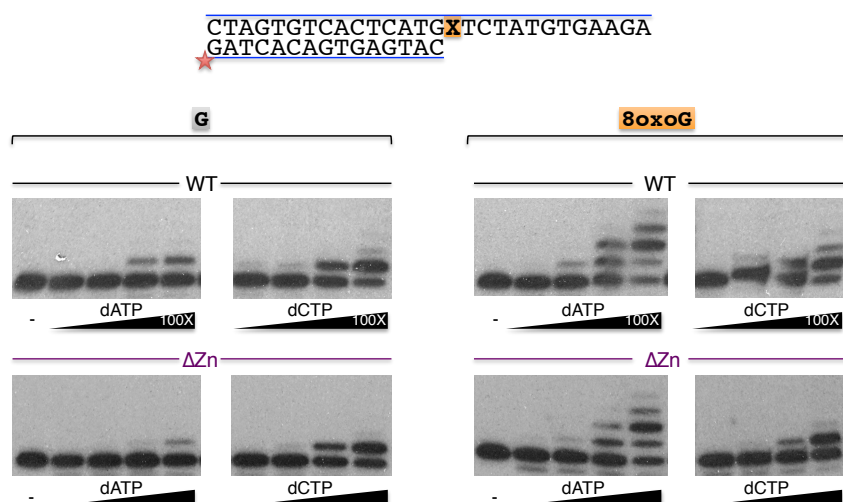


Figura 102. Inserción de dA versus dC frente a 8oxoG por el mutante PrimPol Δ Zn en comparación con la PrimPol WT. Ensayo polimerasa en presencia de un único dNTP (0.01, 0.1, 1 μ M para el enzima WT; 0.1, 1, 10 y 100 nM para PrimPol Δ Zn), bien dATP o dCTP, y utilizando un molde control (G), o con la lesión 8oxoG.

Además, se ensayó la capacidad de inserción del nucleótido libre oxidado 8oxo-dGTP frente a dA o dC en el DNA molde (Fig. 103). El mutante PrimPol Δ Zn se comportó de forma similar a PrimPol WT, insertando 100 veces peor 8oxo-dGTP frente a dC que el nucleótido no modificado dGTP. PrimPol WT insertó 8oxo-dGTP frente a una dA en el molde con la misma eficiencia que dTTP, mientras que PrimPol Δ Zn inserta 100 veces peor el 8oxo-dGTP que el TTP.

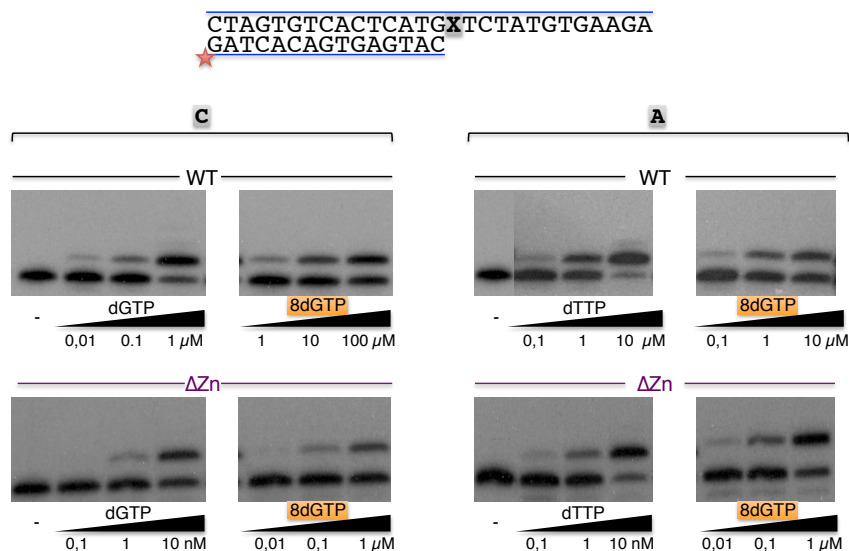


Figura 103. Uso del nucleótido oxidado 8oxo-dGTP, WT versus Δ Zn. Ensayo polimerasa sobre estructuras molde/iniciador con dC como base molde para la inserción de dGTP en comparación con 8dGTP, y con dA para la inserción de TTP en comparación con 8dGTP en las concentraciones indicadas para cada proteína.

Se probaron también las proteínas mutadas en el dedo de zinc sobre una estructura molde/iniciador de DNA que contiene un sitio abásico en el molde (Fig. 104). La versión PrimPol Δ Zn realizó la síntesis a través de la lesión de un modo más eficiente. De nuevo los mutantes puntuales, PrimPolCH y PrimPolCC fueron capaces de sintetizar a través del sitio abásico con un nivel de polimerización similar a PrimPol WT.

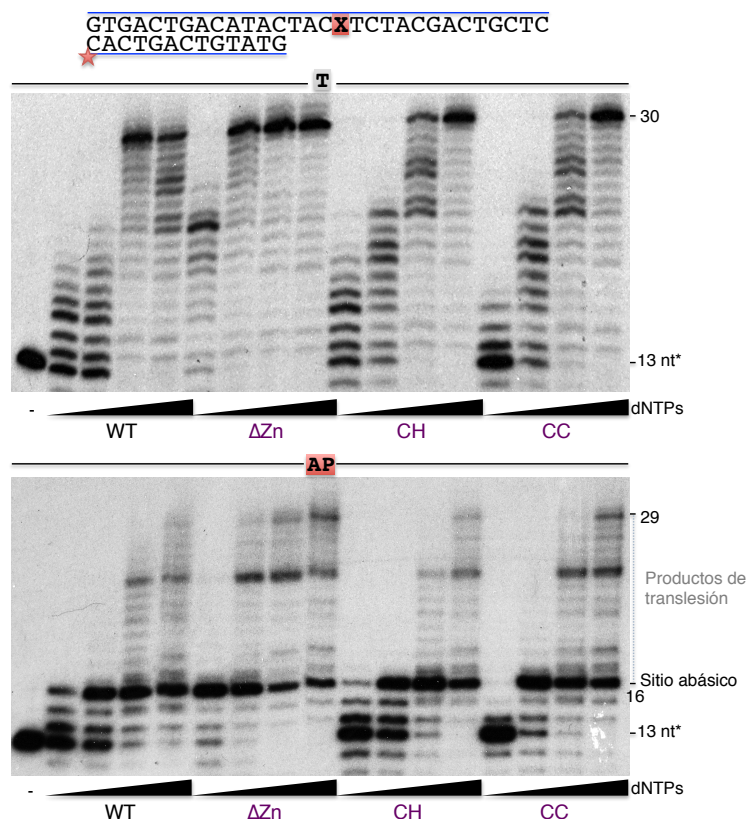


Figura 104. Síntesis a través de un sitio abásico de las proteínas mutadas en el dominio dedo de zinc. Ensayo polimerasa sobre una estructura molde/iniciador donde el sitio abásico se encuentra a tres nucleótidos de distancia del iniciador (panel inferior); en el molde control, la base directora es una timina (panel superior). Se ensayaron cantidades crecientes de dNTPs (0.1, 1, 10 y 100 μ M) y las proteínas WT, Δ Zn, CH y CC.

Por último, se ensayaron los mutantes del dedo de zinc en la translesión de un dímero de timina del tipo CDP (Fig. 105). Tal y como viene describiéndose, tanto el mutante que carece de dedo de zinc (PrimPol Δ Zn) como los que lo tienen inestabilizado debido a las mutaciones puntuales (CH y CC), fueron capaces de sintetizar a través de este molde dañado. De nuevo, el mutante PrimPol Δ Zn llevó a cabo la translesión del CDP con una eficiencia mayor que PrimPol WT.

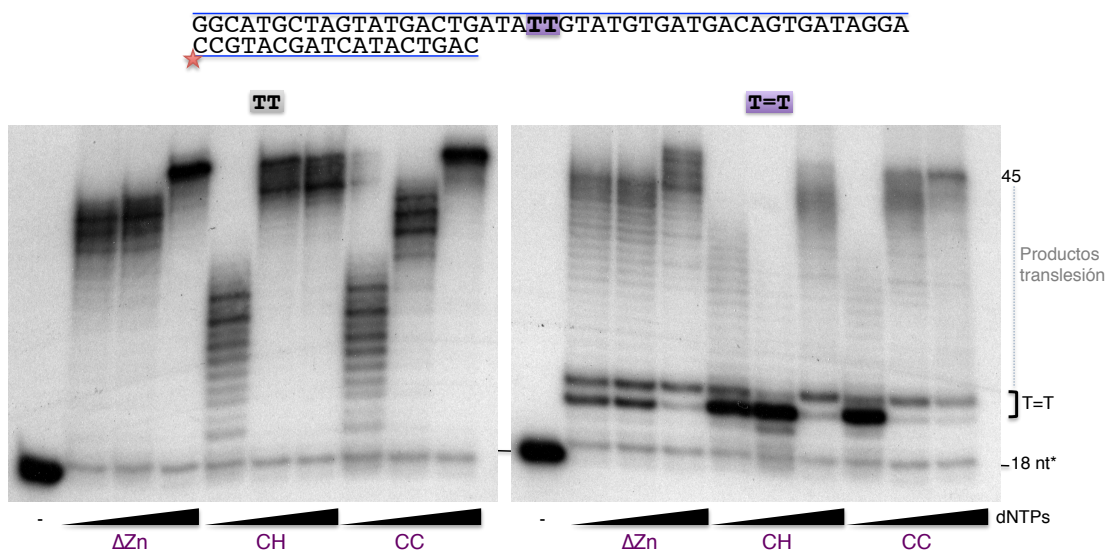


Figura 105. Síntesis a través de un dímero de timinas en el molde, mediada por los mutantes PrimPol Δ Zn, CH y CC. Actividad polimerasa de cada proteína mutada en el dedo de zinc usando dNTPs (1, 10 y 100 μ M) sobre una estructura molde/iniciador donde el molde contiene un ciclobutano que se encuentra a tres nucleótidos de distancia del iniciador.

En conjunto, todos estos experimentos demuestran que, el dominio proteico que potencialmente parece ser un dominio de dedo de zinc no es necesario para la actividad polimerasa de PrimPol. Además, este dominio no interviene en la síntesis a través de lesiones en el molde de DNA durante la función polimerasa de PrimPol.

6.4 Modelo mecanístico de función del dominio dedo de zinc en PrimPol

Las conclusiones extraídas de los resultados obtenidos hasta el momento se basan en la observación del comportamiento de PrimPol cuando carece del dominio por completo, y cuando no posee las cisteínas o la histidina necesarias para coordinar el átomo de zinc en la estructura en forma de dedo. De ellos se puede deducir que el dominio dedo de zinc no es estrictamente necesario para la formación del dinucleótido durante el inicio de la síntesis, aunque estos se forman con mucha menos eficiencia en ausencia de este dominio. Con respecto a la actividad polimerasa, el dominio dedo de zinc no parece intervenir en el mecanismo necesario para dicha actividad y por tanto tampoco interviene en la translesión de daños. En el caso de que este dominio se encuentre desestructurado debido a mutaciones puntuales la eficiencia de polimerización de estas proteínas mutadas es idéntica a la de PrimPol WT. Por otro lado, si el dedo de zinc es eliminado por completo (PrimPol Δ Zn) la actividad polimerasa se encuentra incrementada en un factor de casi 100 veces con respecto a la proteína WT.

En base a todas estas observaciones se desarrolló un modelo mecanístico que podría explicar la función del dominio dedo de zinc durante la síntesis de los iniciadores y la elongación de los mismos. En la [figura 106](#) se observa un esquema de este modelo, donde se refleja que el dedo de zinc es un dominio que será muy probablemente movilizado según el requerimiento de cada contexto de síntesis en el que se encuentre la proteína. Según el modelo, la unión inicial al DNA molde no depende de este dominio, al igual que la unión de los dos primeros nucleótidos, aunque estos se encuentran estabilizados por la presencia del dedo de zinc. Con respecto a la estabilización de los nucleótidos necesarios para la formación del dinucleótido se observó que la falta del dedo de zinc condiciona que la posición 5' una un NTP con más facilidad. Esto puede deberse al grupo 2'-OH que podría aumentar el número de contactos que se pueden establecer con la proteína; por otra parte, se ha descrito que el apareamiento de un ribo frente al DNA es más fuerte y por tanto se vería favorecida la selección de un ribo en 5' del dímero cuando hubiera un déficit de unión como podría ser el caso del mutante PrimPol Δ Zn. La catálisis y formación del dinucleótido no depende estrictamente de este dominio, pero sí el paso de adición de los siguientes nucleótidos. De este modo, es posible que el dedo de zinc esté implicado en cambios conformacionales correspondientes a la translocación del recién formado iniciador, permitiendo las siguientes adiciones de nucleótidos.

No obstante esto no ocurre cuando la proteína se une a una estructura de DNA con un iniciador pre-existente. En este caso, los eventos de translocación no dependen de la presencia del dominio dedo de zinc.

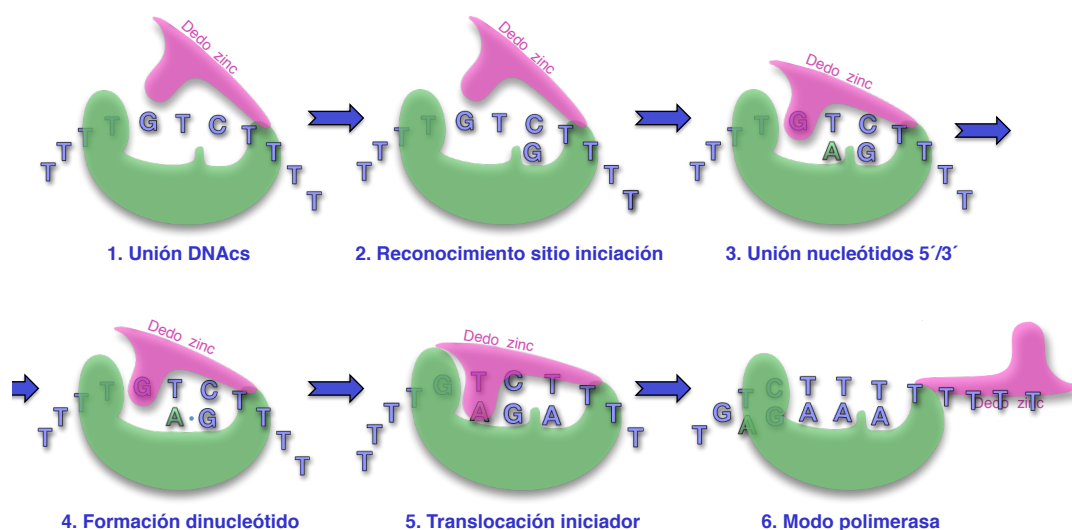


Figura 106. Modelo del posible rol del dominio dedo de zinc durante la síntesis de los iniciadores y la extensión de los mismos. Se representa en verde el *core* de PrimPol y en morado el dominio dedo de zinc. Se esquematiza la unión de la proteína al DNA, el reconocimiento de secuencia en el mismo y la formación del dinucleótido, donde no se simboliza una implicación directa del dedo de zinc. A continuación se debe translocar el iniciador recién formado y para ello es necesaria la presencia y movilización del dedo de zinc. Posteriormente el dominio no es necesario para avanzar por una estructura tipo molde/iniciador.

7.1 Localización subcelular de PrimPol humana

La obtención de anticuerpos contra PrimPol humana purificada permitió llevar a cabo los primeros estudios de expresión, con el objetivo de aproximarnos a la función fisiológica de la proteína. No obstante, para verificar los resultados obtenidos se encargaron unos anticuerpos comerciales que fueron producidos contra un péptido de 20 aa de la zona C-terminal de la proteína. Estos nuevos anticuerpos fueron esenciales para determinar la localización subcelular de PrimPol, es decir, si la proteína fruto de la expresión del gen *CCDC111* es dirigida al núcleo o la mitocondria, ya que podría ejercer su función en replicación de DNA en los dos casos. Además, sus propiedades bioquímicas y capacidad de tolerar lesiones en el DNA serían compatibles con una función en el mantenimiento del genoma nuclear y/o mitocondrial. Este análisis de la localización subcelular se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Juan Méndez en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid. El fraccionamiento subcelular de células HeLa se llevó a cabo según se describe en Materiales y Métodos, utilizando un kit comercial de la empresa Abcam (UK) con el que se obtienen al mismo tiempo las fracciones correspondientes a los tres compartimentos subcelulares: citoplasma, núcleo y mitocondria (Fig. 107). Como control de que el fraccionamiento es correcto, se utilizaron varios anticuerpos contra proteínas que se encuentran selectivamente en cada uno de los diferentes compartimentos. Como marcador para el citoplasma se emplearon anticuerpos contra Mek2 y la α -tubulina, en la mitocondria se utilizaron los anticuerpos contra la ATP-sintasa y la chaperona Hsp60 y para el núcleo se detectó el factor de transcripción CTCF y la histona H3. Como se pudo observar utilizando el anticuerpo contra el péptido de PrimPol, esta se localiza en los tres compartimentos celulares (Fig. 107). La cuantificación de la señal de western mostró que un 47% de PrimPol se encuentra en el citoplasma, un 34% en la mitocondria, y el 19% restante en el núcleo.

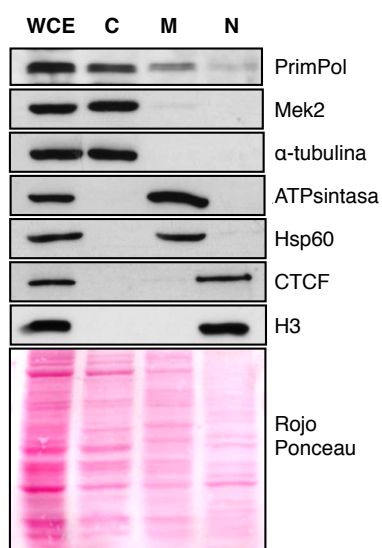


Figura 107. Fraccionamiento subcelular. Separación de las proteínas del extracto total de células (WCE) HeLa en cultivo en los compartimentos del citoplasma (C), mitocondria (M) y núcleo (N). En la parte superior se presenta el western blot para PrimPol, así como para otras proteínas marcadoras de cada compartimento. En la parte inferior se muestra la tinción con Rojo Ponceau de los extractos proteicos cargados en el gel.

Estos resultados nos llevaron a realizar algunos experimentos que intentan precisar tanto la función que posiblemente desempeña PrimPol *in vivo*, así como en qué momentos es necesaria su actuación.

Lo que sabemos de la función de PrimPol hasta el momento es que se trata de una primasa, y que además posee una actividad polimerasa capaz de tolerar lesiones en el DNA. Esta última característica sugiere que PrimPol está involucrada en el proceso de replicación del DNA, ya que se sabe que las DNA polimerasas de translesión desempeñan su función auxiliar durante este proceso cuando las DNA polimerasas replicativas tienen problemas a la hora de progresar a través de daños en el DNA. Por tanto, todo lleva a pensar que PrimPol puede formar parte del grupo de DNA

polimerasas que sintetizan a través de lesiones, que asisten a las DNA polimerasas replicativas y permiten que la replicación del DNA continúe.

Con esta base, se realizaron una serie de experimentos de unión de la proteína PrimPol a estructuras de DNA que mimetizan una horquilla de replicación. Por un lado se probó la capacidad de unión de PrimPol a lo que sería una horquilla abierta madura, producto de un largo trecho de síntesis y formada por un segmento de cadena doble de DNA del que emergen dos cadenas sencillas de DNA. Por otro lado también se probó la unión de PrimPol a un DNA en cadena doble con una burbuja central que expone dos trechos de DNA de cadena sencilla, y que representa una situación de inicio de la replicación. Para corroborar que la unión observada de PrimPol a estas estructuras es específica se llevó como control una de las hebras de DNA (la más larga) como cadena sencilla (Fig. 108). Además, la capacidad de unión de PrimPol a estas estructuras se ensayó tanto en ausencia como en presencia de dNTPs. Como se observa en la figura 108, PrimPol produce una débil banda de retraso, de diferente movilidad cuando se trata de DNA de cadena sencilla (carriles 2 y 3), o bien la horquilla abierta (carriles 5 y 6). Sin embargo, se detectó una unión mucho más estable a la estructura que presenta un burbuja central, preferentemente en presencia de dNTPs (carril 9). Este resultado apoya el papel de PrimPol como primasa durante la replicación del DNA, ya que es capaz de reconocer y unirse de forma estable a una estructura de tipo “burbuja”, en la proximidad de una horquilla de replicación, y ser estabilizada por dNTPs.

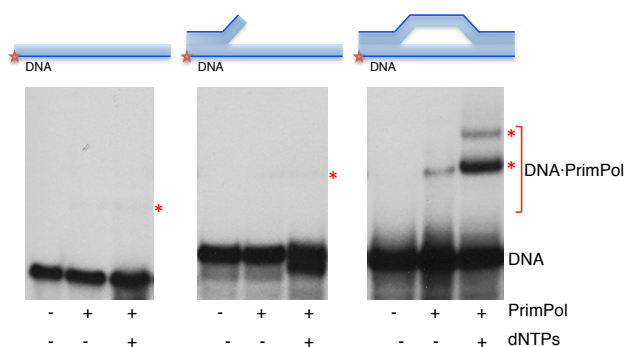


Figura 108. Retardo en gel de estructura de tipo horquilla de replicación. Se muestra la unión de PrimPol con o sin dNTPs a diferentes estructuras de DNA, cadena sencilla, horquilla abierta y burbuja central.

7.2 Función de PrimPol en el compartimento mitocondrial

7.2.1 Posible primasa en mitocondria responsable de la iniciación en el OriL del mtDNA

En mamíferos el genoma mitocondrial es un DNA circular de cadena doble de alrededor de 16.5 kb y las enzimas involucradas en la transcripción y replicación de este DNA están codificadas en el DNA nuclear y deben ser transportadas a la mitocondria desde el citoplasma. Existen dos modelos principales para explicar la replicación del DNA mitocondrial: replicación asimétrica y replicación simétrica. En el modelo de replicación asimétrica la replicación comienza en el origen OriH, donde la RNA polimerasa mitocondrial transcribe un RNA que es empleado como iniciador por la Poly, que es la DNA replicasa mitocondrial. Poly extiende el iniciador hasta tres cuartos del tamaño total del genoma, desplazando por tanto la cadena complementaria que queda en forma de hebra simple cubierta por la SSB mitocondrial. En este punto se descubre el segundo origen de replicación del genoma, OriL, donde empieza la copia de la otra cadena que quedó desplazada. Sobre este punto hay una gran controversia desde hace años, ya que existen varias hipótesis: que una primasa inicie la síntesis en ese OriL o que lo haga de nuevo la RNA polimerasa. El laboratorio del Dr. David Clayton identificó en el año 1985 la presencia de una actividad primasa en la mitocondria que no correspondía con la RNA polimerasa mitocondrial (Wong & Clayton 1985). Describieron una enzima presente en la mitocondria humana que era capaz de iniciar la síntesis empleando NTPs, generando unos productos que podrían ser empleados por la Poly como iniciadores. Además, se implicó a esta primasa como la

responsable de la síntesis del iniciador en el OriL del genoma mitocondrial, donde se llegó a mapear el sitio de comienzo de la síntesis de ese iniciador concreto (Wong & Clayton 1985a). Una actividad primasa similar fue también identificada en extractos de hígado de rata (Ledwith et al. 1986); sin embargo, nunca se identificó la proteína responsable de esta actividad primasa mitocondrial hasta estudios más recientes en algunos tripanosomátidos. En *Trypanosomas* existe una sola mitocondria modificada, de mayor tamaño, llamada kinetoplasto. En estos organismo se han identificado dos genes, pertenecientes a la familia de AEPs, codifican para proteínas con actividad primasa y se ha realizado una caracterización bioquímica de las mismas (Li & Englund 1997; Hines & Ray 2010; Hines & Ray 2011).

La localización mitocondrial de PrimPol nos llevó a pensar que es esta enzima la anteriormente identificada por el laboratorio del Dr. Clayton en los años 80. Por tanto se evaluó la actividad primasa de PrimPol sobre el molde que contiene la secuencia del OriL mitocondrial humano (Fig. 109). PrimPol fue capaz de primar sobre la secuencia del OriL. Para intentar averiguar el sitio específico donde comienza la síntesis del iniciador se realizó un ensayo primasa proporcionando combinaciones de los dNTPs, y llevando siempre $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ para marcar exclusivamente los productos *de novo*. Con la información obtenida de este ensayo se pudieron identificar sitios de comienzo de síntesis sobre la secuencia del OriL mitocondrial, que corresponden con secuencias 3'-TC-5' ya que los iniciadores sintetizados dependieron de aportar la combinación ATP+dGTP. Se compararon estos posibles sitios de iniciación con los resultados obtenidos por el laboratorio del Dr. Clayton y se pudo observar una correlación entre estos sitios y las zonas identificadas como de transición de RNA a DNA.

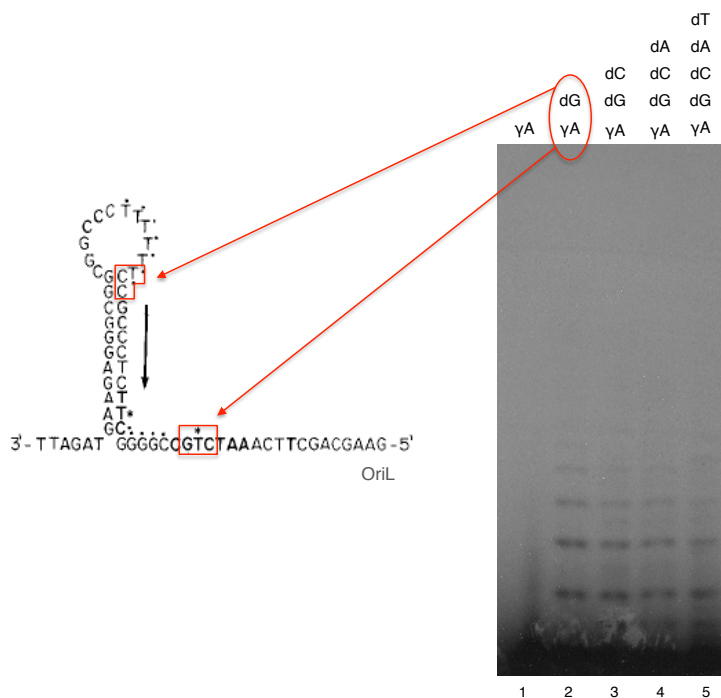


Figura 109. Síntesis de iniciadores por PrimPol en el OriL mitocondrial humano. Actividad primasa de PrimPol sobre el origen de replicación de la cadena L (OriL) utilizando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y varios dNTPs según se indica en la figura. Se señala en la representación esquemática del OriL, los posibles sitios de iniciación.

Durante la realización de este trabajo se describió que la RNA polimerasa mitocondrial sintetiza un iniciador sobre la secuencia OriL, que es posteriormente elongado por la Poly. Por tanto, la RNA polimerasa sería la encargada de sintetizar los iniciadores en ambos orígenes de replicación (OriH y OriL) del DNA mitocondrial (Fusté et al. 2010). Serán necesarios futuros experimentos *in vivo* para esclarecer la función primasa de PrimPol en la mitocondria, y su posible contribución a la iniciación de la síntesis en otros orígenes secundarios, así como su potencial participación en un mecanismo de replicación alternativo que supondría la síntesis de fragmentos de Okazaki, tal y como sugieren algunos autores (Holt et al. 2000).

7.2.2 Síntesis a través de lesiones: Poly vs PrimPol

Las mitocondrias son orgánulos esenciales, que generan la mayoría de la energía de las células a través de la fosforilación oxidativa (Wallace 2005). Durante este proceso se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que se pueden filtrar y reaccionar con una gran cantidad de componentes celulares incluyendo el genoma mitocondrial (Richter et al. 1988). Por tanto, se ha sugerido que los niveles de daño oxidativo del DNA son mayores en el DNA mitocondrial que en el nuclear, con una tasa de acumulación de mutaciones de 10 a 50 veces mayor en el DNA mitocondrial (Hudson et al. 1998; Michikawa et al. 1999; Pakendorf & Stoneking 2005; Yakes & Van Houten 1997). Si este DNA mitocondrial dañado no se repara, puede llevar a la interrupción de la cadena de transporte electrónico (debido a la ausencia de proteínas funcionales) y aumentar la generación de ROS, posiblemente resultando en un círculo vicioso de producción de ROS y por tanto de aumento del daño del DNA mitocondrial, llevando a una disminución de la energía obtenida y por último a la muerte celular (Harman 1972; Miquel et al. 1980). Por tanto, parece obvio que la mitocondria debe tener mecanismos de reparación o defensa contra estas formas de daño.

En comparación con la reparación del DNA nuclear, el conocimiento sobre la reparación del mitocondrial es limitado. De hecho en un principio se pensaba que el DNA mitocondrial no era reparado sino que simplemente se degradaba (Clayton et al. 1974). Ahora se sabe que los mecanismo de reparación y el control de la degradación del DNA trabajan en conjunto para mantener la integridad del genoma mitocondrial (Berneburg et al. 2006; Liu & Demple 2010). Inicialmente, se descubrió la reparación por escisión de base de trecho corto (Stierum et al. 1999), más recientemente se han obtenido evidencias de la presencia de mecanismos de reparación por escisión de base de trecho largo (Akbari et al. 2008; Liu et al. 2008), reparación de apareamientos erróneos (de Souza-Pinto et al. 2009; Mason et al. 2003), recombinación homóloga y reunión de extremos no-homólogos (Bacman et al. 2009; Fukui & Moraes 2009; Thyagarajan et al. 1996). La mayoría de las proteínas encargadas de la reparación del DNA mitocondrial están codificadas en el DNA nuclear y deben ser importadas a la mitocondria (Bohr 2002).

Hasta el momento, la única DNA polimerasa descrita en la mitocondria de células eucarióticas, es la Poly (Ropp & Copeland 1996). La holoenzima Poly consiste en una subunidad catalítica (codificada por el gen POLG1 en el núcleo) y una forma dimérica de la subunidad accesoria (codificada por POLG2 en el núcleo). La subunidad catalítica de la enzima (p140) posee actividad DNA polimerasa, exonucleasa 3'-5' y actividad dRP liasa (Graziewicz et al. 2006). La subunidad accesoria (p55) se requiere para una mayor unión al DNA y una síntesis procesiva del DNA (Lim et al. 1999). Al ser la única DNA polimerasa presente en la mitocondria, se involucra a Poly en los procesos de replicación, reparación y tolerancia al daño del DNA mitocondrial.

La presencia de PrimPol en la mitocondria nos llevó a pensar en el papel que podría tener esta proteína en dicho orgánulo. De acuerdo con todas las características bioquímicas previamente descritas, PrimPol parece estar involucrada principalmente en la síntesis a través de lesiones en el DNA. Se ha reportado que Poly es capaz de sintetizar a través de algunos daños en el DNA de modo que se realizaron una serie de ensayos de translesión de daños presentes en el DNA molde, comparando la acción de Poly y PrimPol.

En primer lugar se ensayó la actividad DNA polimerasa de translesión de Poly y PrimPol sobre una estructura de DNA de tipo molde/iniciador que contiene una guanina oxidada, es decir, un 8oxoG en el molde a 3 nucleótidos de distancia del extremo del iniciador. Poly demostró ser poco eficiente cuando sintetiza a través de la lesión 8oxoG, observándose translesión solo desde concentraciones altas de dNTPs (Fig. 110A). PrimPol, como ya se ha descrito anteriormente, realiza una síntesis a través de la base oxidada prácticamente con la misma eficiencia que frente al molde control sin daño (Fig. 110C). Ambos ensayos se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima usando para

Poly como cofactor metálico MgCl_2 a 10 mM mientras que para PrimPol se usó MnCl_2 a 1 mM. Para corroborar que estas son, en efecto, las condiciones óptimas para cada enzima se realizaron de nuevo los mismo ensayos, empleando en este caso Mn^{2+} para Poly y Mg^{2+} para PrimPol. La actividad de translesión de Poly no se vio mejorada con la presencia de iones Mn^{2+} , aunque se sabe que dicho metal incrementa la frecuencia de mutaciones llevadas a cabo por Poly (Kunkel 1985). Además, la actividad DNA polimerasa de Poly es fuertemente inhibida debido a la gran estimulación de su actividad correctora de errores, 3'-5' exonucleasa en presencia de iones Mn^{2+} (Fig. 110B). Por tanto, Poly no solo no saca ventaja del uso de Mn^{2+} como cofactor metálico durante la translesión, sino que su uso va en detrimento de su escasa capacidad de sintetizar a través de un 8oxoG en el molde. Por otro lado, como se ha mostrado anteriormente, PrimPol posee una actividad DNA polimerasa muy limitada en presencia de Mg^{2+} (Fig. 110D). Aunque anteriormente se ha descrito que Poly tiene cierta capacidad de sintetizar a través de un 8oxoG en el molde, incorporando dCTP mayoritariamente (Pinz et al. 1995), PrimPol es mucho más eficiente para llevar a cabo esa función.

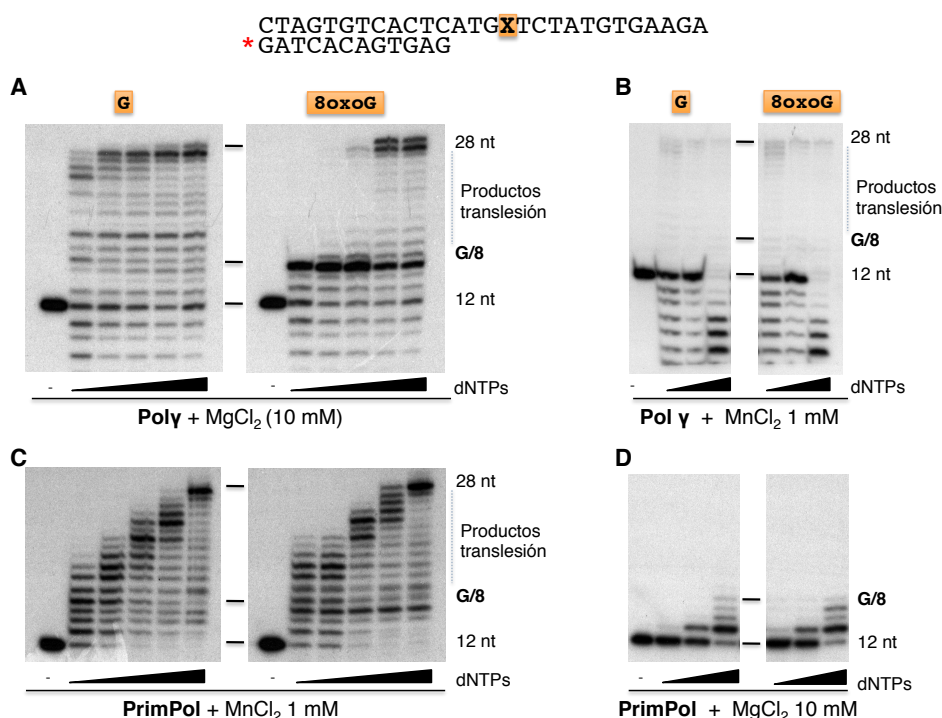


Figura 110. Capacidad de síntesis a través de 8oxoG de Poly en comparación con PrimPol. **A.** Ensayo de síntesis translesión de la proteína Poly sobre un molde que contiene una base oxidada (8oxoG) y su control (G) con concentraciones crecientes de dNTPs (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM) y MgCl_2 (10 mM) como metal activador. **B.** Actividad DNA polimerasa de Poly a través de 8oxoG en el molde utilizando dNTPs (1, 10 y 100 μM) y MnCl_2 (1 mM) como metal activador. **C.** Actividad de síntesis a través de 8oxoG de PrimPol empleando dNTPs (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM) y MnCl_2 (1 mM) como metal activador. **D.** Polimerización a través de un sitio 8oxoG en el molde con dNTPs (1, 10 y 100 μM) y MgCl_2 (10 mM) como metal activador.

Valoramos también la capacidad de Poly de sintetizar a través de un sitio abásico en comparación con la capacidad de PrimPol (Fig. 111). Poly se para por completo ante un sitio en el DNA que no contiene la información necesaria para dirigir la incorporación de un dNTP entrante (Fig. 111A), por lo que no se observa translesión de un sitio abásico. PrimPol es capaz de tolerar el sitio abásico, llegando a extender casi un 60% del iniciador (Fig. 111C). De nuevo, se ensayaron las proteínas en presencia de los diferentes metales activadores Mg^{2+} y Mn^{2+} para comprobar que las condiciones ensayadas son las óptimas para Poly y PrimPol (Fig. 111B y 111D). Como vimos en el capítulo 5, el análisis del tamaño máximo alcanzado en el ensayo sugiere que PrimPol no “copia” el sitio abásico,

sino que literalmente se lo salta, continuando la copia de las bases siguientes del molde. A pesar de ello, PrimPol sería única DNA polimerasa que posee la capacidad de sintetizar a través de un sitio abásico presente en el DNA mitocondrial.

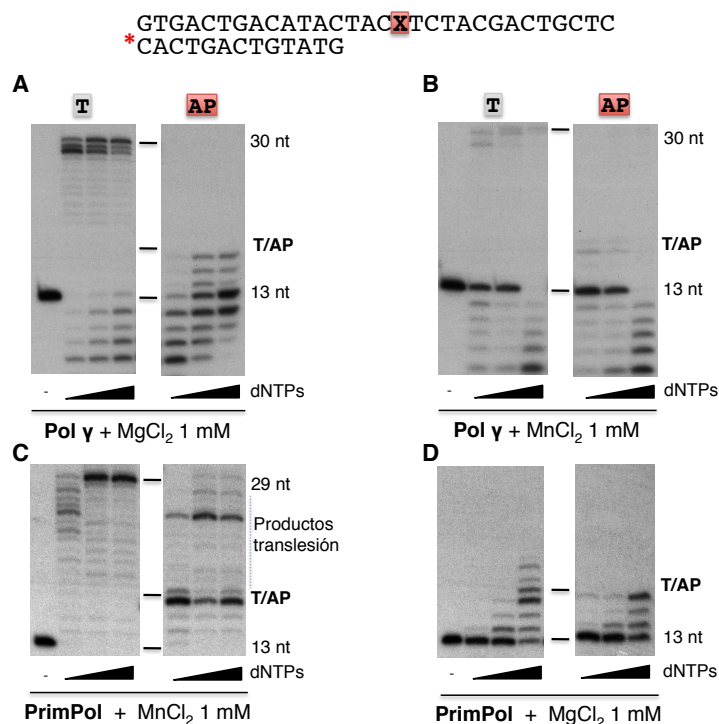


Figura 111. Capacidad de síntesis a través de sitio abásico de Poly en comparación con PrimPol. A. Ensayo de síntesis translesión de la proteína Poly (20 nM) sobre un molde que contiene un sitio abásico (X) y su control (T) con concentraciones crecientes de dNTPs (1, 10 y 100 μ M) y MgCl₂ (10 mM) como metal activador. **B.** Actividad DNA polimerasa de Poly a través de un sitio abásico en el molde utilizando dNTPs (1, 10 y 100 μ M) y MnCl₂ (1 mM) como metal activador. **C.** Actividad de síntesis a través de un sitio abásico de PrimPol (200 nM) empleando dNTPs (1, 10 y 100 μ M) y MnCl₂ (1 mM) como metal activador. **D.** Polimerización a través de un sitio abásico en el molde con dNTPs (1, 10 y 100 μ M) y MgCl₂ (10 mM) como metal activador.

Por último se evaluó la capacidad de Poly de sintetizar a través de un dímero de timinas. Normalmente este tipo de lesiones bloquean a las DNA polimerasas replicativas, y deben ser eliminadas mediante el proceso de reparación por escisión de nucleótido (NER). La mitocondria carece de este mecanismo por lo que es importante entender cómo en el DNA mitocondrial se tolera este tipo de lesiones. En estudios anteriores se ha evaluado, *in vitro*, la capacidad de Poly de sintetizar a través de un dímero de timinas sobre las que incorpora dos adeninas (Kasiviswanathan et al. 2012). Como se observa en la [figura 112A](#), Poly realiza una síntesis a través de una lesión CPD (ciclobutano de dos timinas adyacentes) muy limitada, ya que alcanza únicamente el 14% a la mayor concentración de dNTPs ensayada. PrimPol, por el contrario, lleva a cabo la reacción de translesión del CPD desde bajas concentraciones de dNTPs ([Fig. 112B](#)), lo que sugiere que podría participar en la tolerancia a este daño en el DNA mitocondrial.

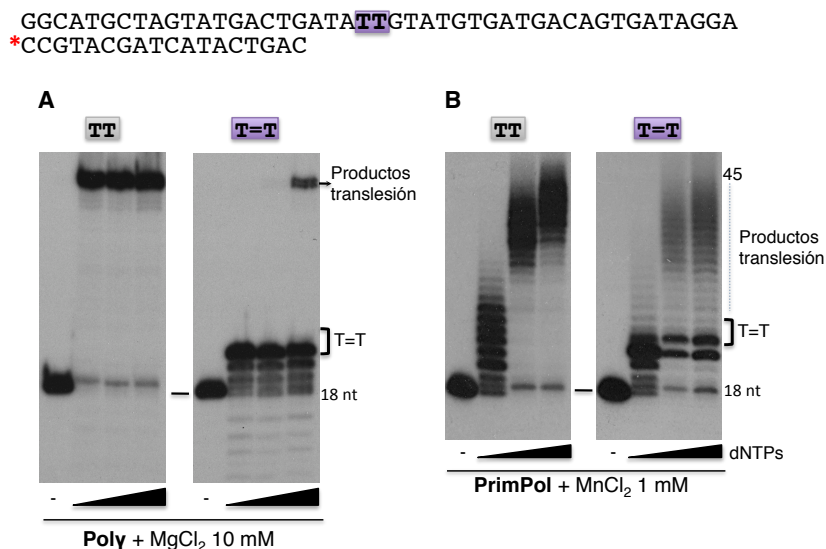


Figura 112. Capacidad de síntesis a través de un dímero de timinas de Poly en comparación con PrimPol.
A. Ensayo de síntesis translesión de la proteína Poly (20 nM) sobre un molde que contiene un dímero de timinas (T=T) y su control (TT) con concentraciones crecientes de dNTPs (1, 10 y 100 μ M) y $MgCl_2$ (10 mM) como metal activador. **B.** Actividad de síntesis a través de un dímero de timinas de PrimPol (200 nM) empleando dNTPs (1, 10 y 100 μ M) y $MnCl_2$ (1 mM) como metal activador.

7.2.3 Poly utiliza eficientemente los iniciadores de RNA/DNA sintetizados por PrimPol

Como ya se ha demostrado PrimPol puede actuar de dos maneras: como DNA polimerasa de translesión y como primasa. Por tanto, Poly debe ser capaz de aceptar y extender los iniciadores que puedan ser sintetizados (o extendidos temporalmente) por PrimPol, y quizás sea necesaria incluso una interacción entre ambas proteínas para llevar a cabo este proceso. Por tanto, se llevaron a cabo una serie de experimentos para valorar la capacidad de Poly de utilizar los iniciadores de RNA y DNA sintetizados por PrimPol (Fig. 113). Como primera aproximación se midió la incorporación de dNTPs durante la polimerización sobre un M13cs como molde, un ensayo que requiere estrictamente una actividad primasa para permitir la elongación por Poly. Como PrimPol es capaz de emplear tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos este experimento se realizó en dos pasos. Durante el primer paso se permitió que PrimPol generara pequeños iniciadores no marcados con radiactividad sobre el M13cs. Para ello se empleó una combinación incompleta de nucleótidos (ATP, UTP y CTP o dATP, dTTP y dCTTP) que hace que PrimPol no pueda llevar a cabo la síntesis y elongación de los iniciadores; y el metal requerido para su activación. En el segundo paso, la reacción se diluyó dos veces (para dejar una concentración final de Mn^{2+} que no sea perjudicial para la actividad de Poly) y fue incubada en presencia o ausencia de Poly, iones Mg^{2+} y todos los dNTPs (uno de ellos marcado radiactivamente, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$). En la figura 113 se observa cómo PrimPol puede incorporar el dNTP marcado durante la iniciación, y hacer una extensión de los iniciadores sintetizados en el primer paso. Poly puede utilizar los iniciadores sintetizados por PrimPol ya sean estos de RNA o DNA (Fig. 113 carriles 6 y 7); por el contrario, si PrimPol no se añade en el primer paso (carriles 4 y 5) la adición de Poly en el segundo paso es improductiva. Además, de acuerdo con la preferencia de PrimPol de emplear dNTPs para la síntesis de los iniciadores, se observa una mayor reacción sinérgica entre PrimPol y Poly cuando los dNTPs son empleados en el primer paso (carril 7).

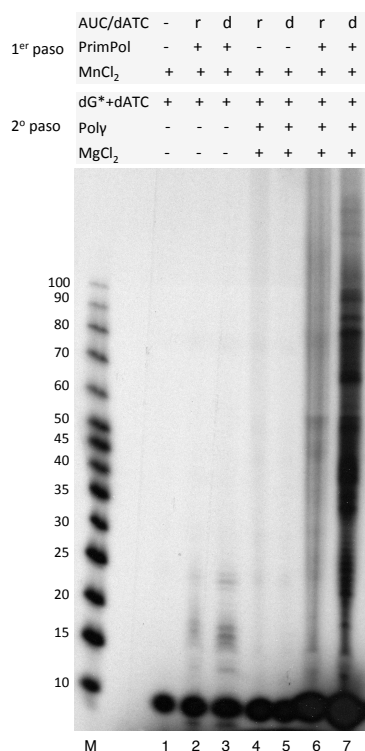


Figura 113. Los iniciadores sintetizados por PrimPol son usados por Poly (ensayo en dos pasos). En el primer paso de la reacción se favorece la síntesis de iniciadores truncados sobre el molde M13cs (10 ng/ μ l) por PrimPol (400 nM), añadiendo ribonucleótidos (AUC=r) o desoxirribonucleótidos (dATC=d) (100 μ M) y MnCl₂ (1mM); la reacción es incubada a 30°C durante 30 min. En el segundo paso se añade Poly (20 nM), el metal necesario para su activación (MgCl₂ 10 mM) y un suplemento de dNTPs (dATP, dCTP y dTTP hasta 150 μ M), estando siempre presente el [α -³²P]dGTP (16 nM). Este paso se incubaba a 37°C durante 30 min.

Considerando estos resultados iniciales, se diseñó un experimento en un solo paso para demostrar que PrimPol y Poly pueden actuar conjuntamente durante la replicación del DNA mitocondrial. Previamente confirmamos que los iones Mn²⁺ (100 μ M) no son perjudiciales para la actividad de Poly. De nuevo, la incorporación de dNTPs fue evaluada para cada una de las proteínas o cuando están presentes de forma simultánea (Fig. 114). Se llevó a cabo el ensayo en presencia de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP y [α -³²P] dGTP) y los metales Mn²⁺ (100 μ M) y Mg²⁺ (10 mM) y se añadió, cuando se indica, un extra de dGTP o GTP para potenciar las iniciaciones de PrimPol (ya que prefiere iniciar la síntesis con una purina). Tras la incubación los productos sintetizados, marcados radiactivamente, se detectan asociados al M13cs ya que se trata de un análisis nativo. En presencia de PrimPol exclusivamente se observa un ligero marcaje de los iniciadores sintetizados (carriles 2 y 5); por otra parte la presencia de Poly por sí sola es improductiva (carriles 3 y 6). Cuando ambas enzimas se añaden simultáneamente se observa una reacción que refleja un efecto sinérgico entre ambas proteínas que actúan de un modo coordinado (carriles 4 y 7). Empleando estas condiciones optimizadas (esquematisadas en la Fig. 114B) se evaluó si concentraciones más limitantes de PrimPol y Mn²⁺ son efectivas para generar una elongación mediada por Poly (Fig. 114C). En este experimento puede observarse cómo los productos finales de elongación de Poly sobre los iniciadores sintetizados por PrimPol dependen directamente de la cantidad de enzima PrimPol (carriles 4 a 8) y del metal activador de la misma (Mn²⁺) (carriles 9 a 11), de modo que si la actividad de PrimPol se ve potenciada esto se ve reflejado en una mayor actividad de polimerización de Poly. Asimismo, la sinergia de ambas enzimas permite detectar actividad a concentraciones de Mn²⁺ próximas a las fisiológicas.

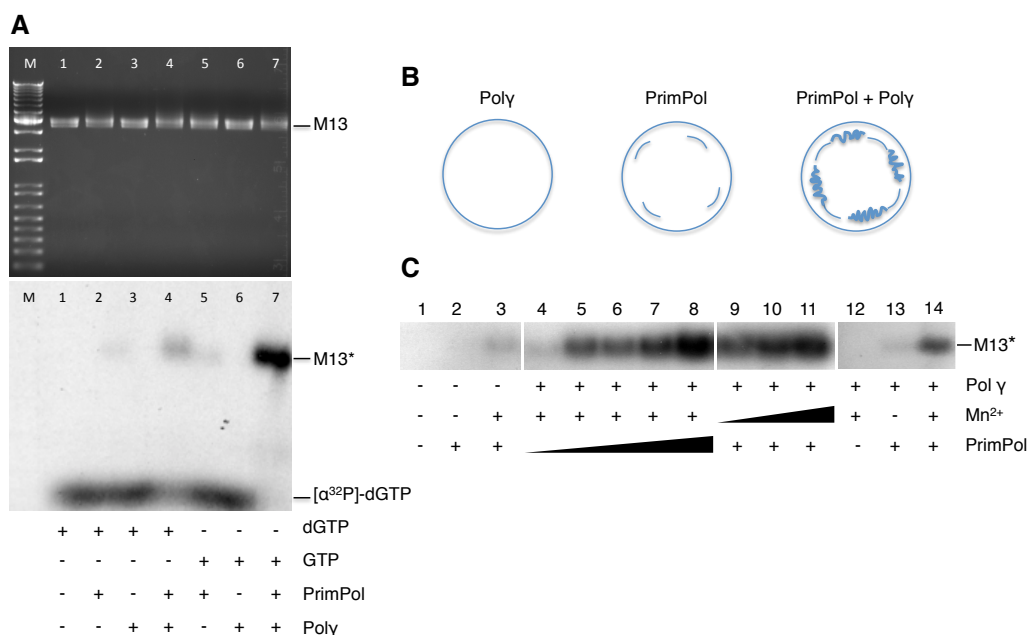


Figura 114. Los iniciadores sintetizados por PrimPol son usados por Poly. **A.** Se incuban PrimPol (400 nM) y Poly (20 nM), juntas (carriles 4 y 7) o por separado según se indique, con los metales necesarios para la activación de cada una ($MnCl_2$ 100 μM y $MgCl_2$ 10 mM) y dNTPs (dATP, dCTP y dTTP a 100 μM y $[\alpha\text{-}^{32}P]$ dGTP a 16 nM). Se potencia la formación de iniciadores añadiendo dGTP (1 μM) (carriles 2 a 4) o GTP (100 μM) (carriles 5 a 7). **B.** Esquema de la reacción llevada a cabo en A y C. **C.** Se evaluaron diferentes dosis de la proteína PrimPol y el metal Mn^{2+} . El ensayo contiene M13cs (10 ng/ μl), dNTPs (dATP, dCTP y dTTP a 100 μM , $[\alpha\text{-}^{32}P]$ dGTP a 16 nM y GTP a 100 μM) y $MgCl_2$ (10 mM). Se ensayó la capacidad de iniciar la síntesis de PrimPol en esas condiciones en ausencia de Poly (carriles 1, 2 y 3). Se evaluaron concentraciones crecientes de PrimPol (0, 50, 100, 200 y 400 nM) con $MnCl_2$ (100 μM) en presencia de Poly (20 nM) (carriles 4 a 8). Se ensayaron concentraciones crecientes de $MnCl_2$ (10, 50 y 100 μM) con PrimPol (400 nM) y Poly (20 nM) constantes (carriles 9 a 11). Finalmente se comprueba que Poly no da señal en ausencia de PrimPol y que PrimPol sola da una señal baja que se incrementa en presencia de Poly.

7.2.4 Predicción de secuencia de localización mitocondrial en PrimPol

Más del 98% de las proteínas mitocondriales son sintetizadas en el citoplasma como preproteínas que deben ser posteriormente transportadas a la mitocondria. Se usaron varios algoritmos disponibles para predecir la localización subcelular de PrimPol. Prácticamente todos los programas predicen una localización parcial en citoplasma, núcleo y mitocondria, sin localizar una secuencia concreta dentro de PrimPol. Estas predicciones son compatibles con los resultados obtenidos en el fraccionamiento subcelular que se muestra en la [figura 107](#). El tipo más común de señal de localización mitocondrial es una extensión amino terminal de la proteína normalmente de 20 a 50 residuos aminoácidos. El péptido señal de muchas proteínas mitocondriales no muestra una secuencia consenso estricta pero sí tienen unas características físico químicas determinadas. Son secuencias enriquecidas en residuos cargados positivamente, hidroxilados e hidrofóbicos y tienen alto potencial de formar una hélice α anfipática. En la hélice, los residuos cargados positivamente se localizan hacia un lado de la hélice y en el lado opuesto se encuentran los no cargados y los hidrofóbicos. La maquinaria de importación de proteínas se encuentra en la membrana mitocondrial que contiene una serie de receptores que sucesivamente interaccionan con el péptido señal de la proteína que finalmente será eliminado de la pre-proteína por una peptidasa.

PrimPol contiene en su extremo amino terminal un dominio denominado *coiled-coil* en los primeros 22 aminoácidos. Este dominio normalmente forma una hélice α anfipática, lo que puede encajar con el requerimiento que tiene la secuencia de localización mitocondrial. De modo que se decidió evaluar si este dominio N-terminal (de 29 aa) resulta dispensable para las actividades conocidas de PrimPol,

como se esperaría si fuese eliminada de la proteína como parte del péptido señal. Se diseñó y purificó el mutante de delección sin el dominio *coiled-coil*, al que se denomina PrimPol Δ CCD. Se evaluó la actividad primasa y polimerasa de PrimPol Δ CCD en comparación con la versión PrimPol WT. Se evaluó la actividad primasa sobre el oligo específico Gtcc, empleando dNTPs y sobre M13cs, empleando tanto NTPs como dNTPs (Fig. 115A y 115B). Además se ensayó la actividad polimerasa sobre un sustrato de DNA del tipo molde/iniciador usando dNTPs (Fig. 102C). PrimPol Δ CCD conservó las mismas actividades que la versión WT de PrimPol por lo que si, en efecto, este dominio *coiled-coil* fuese el péptido señal su eliminación no resultaría perjudicial para la actividad de PrimPol.

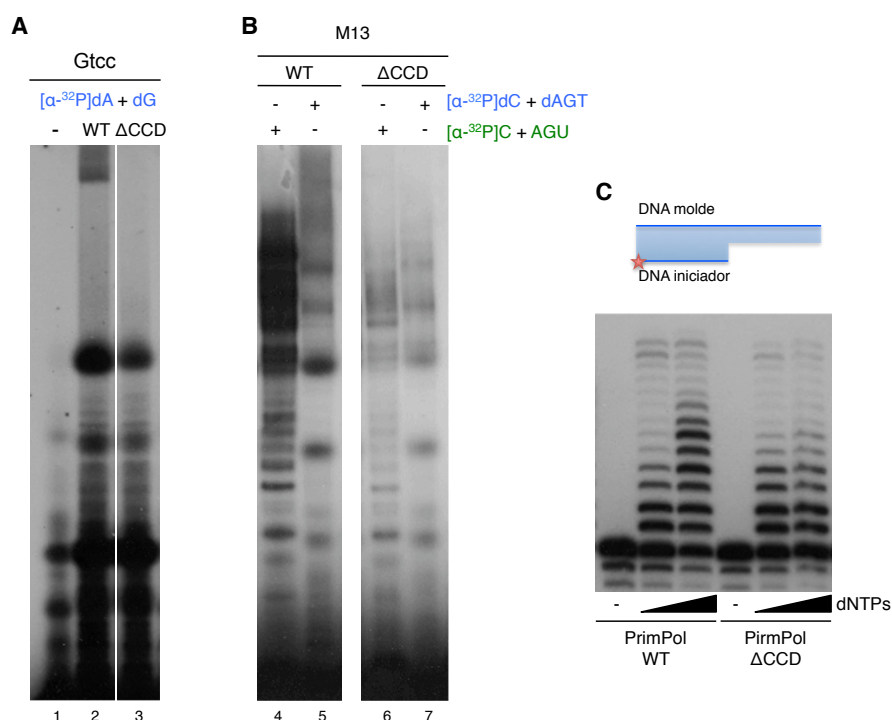


Figura 115. Actividad primasa y DNA polimerasa de PrimPol Δ CCD. **A.** Actividad primasa de PrimPol WT y la versión carente del dominio *coiled-coil* (Δ CCD) sobre el molde Gtcc (1 μ M) utilizando [α-³²P]dATP (16 nM) y dGTP (10 μ M) y MnCl₂ (1 mM). **B.** Actividad primasa sobre M13cs (10 ng/ μ l) empleando NTPs, A/U/G (100 μ M) y [α-³²P]dCTP (16 nM) o dNTPs, dA/T/G (100 μ M) y [α-³²P]CTP (16 nM). **C.** Actividad DNA polimerasa de PrimPol WT y PrimPol Δ CCD sobre una estructura de DNA tipo molde/iniciador con concentraciones crecientes de dNTPs (10 y 100 nM) y MnCl₂ (1 mM).

7.3 Inhibidores específicos de PrimPol

Existen varios inhibidores de primasas y polimerasas que se emplean como fármacos bactericidas, anti-víricos, y anti-tumorales. La acción de la mayoría de ellos consiste en inhibir el crecimiento celular mediante la capacidad que tienen de provocar la apoptosis celular. Además, esta muerte celular programada sigue la vía intrínseca de señalización para la apoptosis. Esto quiere decir, que en respuesta al daño celular recibido, en forma de daño en el DNA, se activa una ruta que media la salida del citocromo C de la mitocondria (que normalmente actúa como transportador de electrones en la cadena respiratoria) provoca la activación de las caspasas y por tanto la apoptosis.

También se han descrito numerosos tumores resistentes a los inhibidores empleados como anti-tumorales, que en algún caso se ha relacionado con un aumento de la masa mitocondrial, este dato es relevante ya que la localización principal de PrimPol es la mitocondria. Además resulta interesante saber si los inhibidores que afectan a la primasa nuclear (Prim1) afectan también a PrimPol, o si por el contrario PrimPol puede sustituir la labor de esta primasa favoreciendo la resistencia de los tumores.

7.3.1 Ara-citidina-5'-trifosfato (AraCTP)

AraCTP (o citarabina), que es un análogo del nucleósido citosina, que posee arabinosa en lugar de la ribosa o la desoxirribosa (Fig. 116A). Este análogo de nucleótido es empleado como terapia antitumoral con gran éxito en leucemia mielógena (Keating et al. 1982; Estey et al. 1987; Mastrianni et al. 1992). La leucemia mielógena es un cáncer de los tejidos de la médula ósea que afecta a la estirpe mieloide (eritrocitos, plaquetas, leucocitos granulares y macrófagos), a diferencia de la leucemia linfóide que afecta a la estirpe linfóide (linfocitos B, T y NK).

Se ha descrito que AraC inhibe la proliferación celular y la replicación en células de mamífero (Graham & Whitmore 1970). Existen varias hipótesis acerca de cual es el mecanismo por el que media su efecto. Por un lado, se ha descrito la inhibición de la replicación porque AraCTP y dCTP compiten por el sitio de unión a la Polα inhibiendo su actividad enzimática (Furth & Cohen 1968). Por otro lado, algunos autores proponen que es la incorporación en el DNA la causante de la inhibición de la replicación (Kufe et al. 1980; Major et al. 1981). Existen estudios que describen que la incorporación en el DNA inhibe la iniciación de la síntesis de DNA (Bell & Fridland 1980). Sin embargo, otros estudios describen que la presencia de AraCMP en el extremo 3' del DNA interfiere con la elongación del DNA que se está replicando y no con la iniciación de la síntesis (Mikita & Beardsley 1988; Perrino & Mekosh 1992).

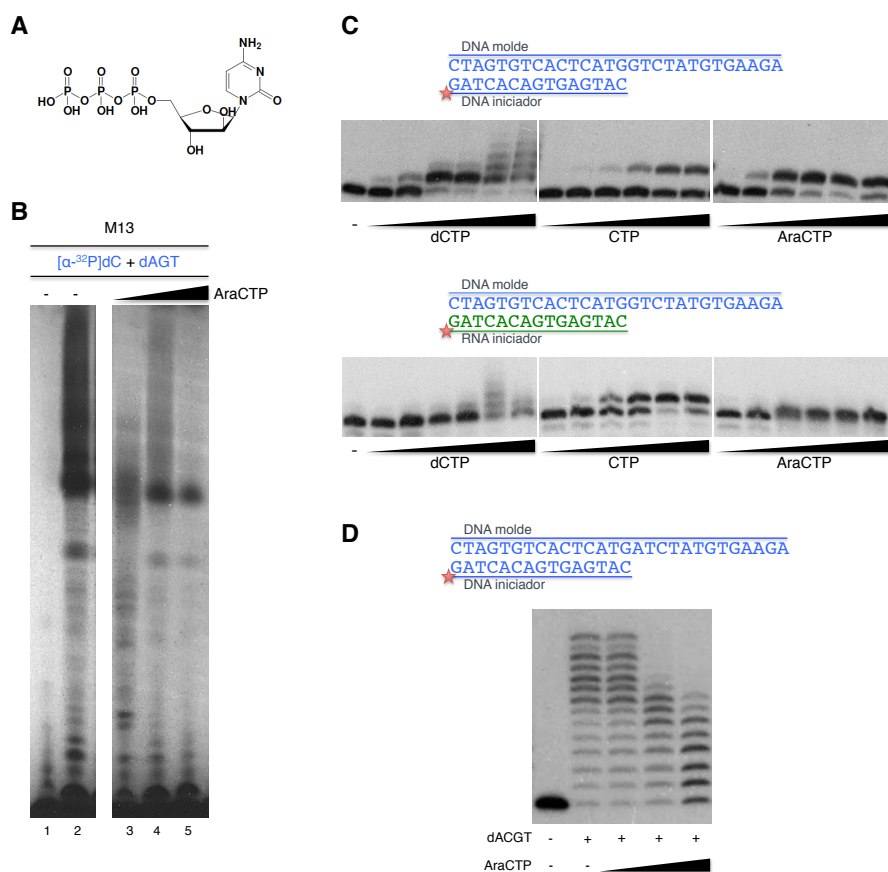


Figura 116. Efecto del AraCTP sobre las actividades de PrimPol. **A.** Representación de la molécula AraCTP. **B.** Ensayo primasa sobre M13cs (10 ng/μl) de PrimPol con dNTPs, dA/T/G (100 μM) y [α-³²P]CTP (16 nM) y concentraciones crecientes del inhibidor AraCTP (10, 100 μM y 1 mM). **C.** Incorporación del AraCTP en comparación con dCTP y CTP (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM y 1 mM) sobre una molécula de DNA de tipo molde/iniciador, siendo el iniciador de DNA (paneles superiores) o de RNA (paneles inferiores). **D.** Inhibición de la actividad DNA polimerasa de PrimPol por la adición de AraCTP (0.1, 1 y 10 μM) en un ensayo con dNTPs (10 μM).

Se estudió la capacidad de PrimPol de incorporar este análogo de dCTP durante la síntesis, ya sea actuando como primasa o como polimerasa. En primer lugar se realizó un ensayo de actividad primasa empleando M13cs como molde y dNTPs (uno de ellos marcado radiactivamente), al que se añadió concentraciones crecientes del análogo araCTP (Fig. 116B). Se observó que la adición del araCTP afecta, a bajas concentraciones, la extensión de los iniciadores, mientras que a alta concentración provoca una inhibición total de la síntesis de iniciadores. Quisimos averiguar si PrimPol era capaz de incorporar este análogo al DNA, así que ensayamos su posible inserción en moléculas del tipo molde/iniciador, pudiendo ser este iniciador de DNA o RNA y lo comparamos con la inserción de dCTP o CTP. PrimPol insertó el araCTP con la misma eficiencia que un dCTP sobre una estructura donde el iniciador es de DNA (Fig. 116C superior); sin embargo, no fue capaz de insertarlo cuando el iniciador es de RNA (Fig. 116C inferior). Para averiguar si esta inserción específica de araCTP resultaría en una inhibición de la extensión, se realizó un ensayo DNA polimerasa con un molde/iniciador de DNA y todos los dNTPs, añadiendo concentraciones crecientes de araCTP. La incorporación de araCTP produjo, desde bajas concentraciones, la inhibición de la polimerización (Fig. 116D).

7.3.2 3'-Desoxi-adenosina-5'-trifosfato (3'dATP)

El 3'dATP, o cordicepina, es un derivado del nucleósido adenosina, cuya diferencia es la ausencia de un grupo OH en la posición 3'de la ribosa (Fig. 117A). Este análogo de nucleótido actúa como terminador de cadena ya que cuando es incorporado por las RNA polimerasas no puede extenderse debido a la ausencia del grupo 3'-OH necesario para llevar a cabo el ataque nucleofílico. Se sabe que el 3'dATP actúa como terminador de cadena en células eucarióticas ya que puede ser insertado tanto por la primasa nuclear (Izuta et al. 1996) como por la RNA polimerasa mitocondrial (Arnold et al. 2012) y además inhibe la adición del poliA en los RNAm (Rose et al. 1977).

Se ha demostrado que PrimPol no utiliza análogos de dNTPs (ddNTPs) que actúan del mismo modo como terminadores de cadena durante la polimerización. Cabe especular que quizás PrimPol establezca interacciones con el extremo 3'del nucleótido y que por tanto al estar ausente en estos análogos no fueron utilizados como sustratos por PrimPol. Por tanto nos pareció interesante averiguar cómo afecta este terminador de cadena a la síntesis llevada a cabo por PrimPol. Se realizó un ensayo primasa sobre el oligo específico Gtcc, añadiendo [γ - 32 P]ATP, dGTP y concentraciones crecientes del cordicepina (3'dATP), observándose una reducción de los iniciadores sintetizados sobre este molde desde una concentración de inhibidor de 100 μ M (Fig. 117B). Posteriormente se realizaron ensayos polimerasa para investigar si esta inhibición observada es causada por la incorporación del terminador de cadena. Se evaluó la posible inserción del 3'dATP en comparación con dATP o ATP sobre una estructura de tipo molde/iniciador pudiendo ser este de DNA o RNA ya que sabemos la versatilidad que posee PrimPol para usar ambos tipos de iniciadores. Como se observa en la figura 117C, PrimPol no inserta este análogo de nucleótido. PrimPol no inserta 3'dATP, pero sí produce una inhibición de la síntesis de DNA, por lo que puede tratarse de un inhibidor por competición, con el nucleótido normal, que dificulta su entrada en el sitio activo de la proteína. Por tanto, se realizó un experimento de DNA polimerasa evaluando la inserción de una concentración fija de dATP sobre un iniciador de DNA, o de ATP sobre un iniciador de RNA, en presencia de concentraciones crecientes de 3'dATP. En efecto, la cordicepina logró inhibir la síntesis en ambos casos, pero únicamente a partir de una concentración relativamente alta (100 μ M) del inhibidor (Fig. 117D), al igual que ocurría en el ensayo de primasa (Fig. 117B).

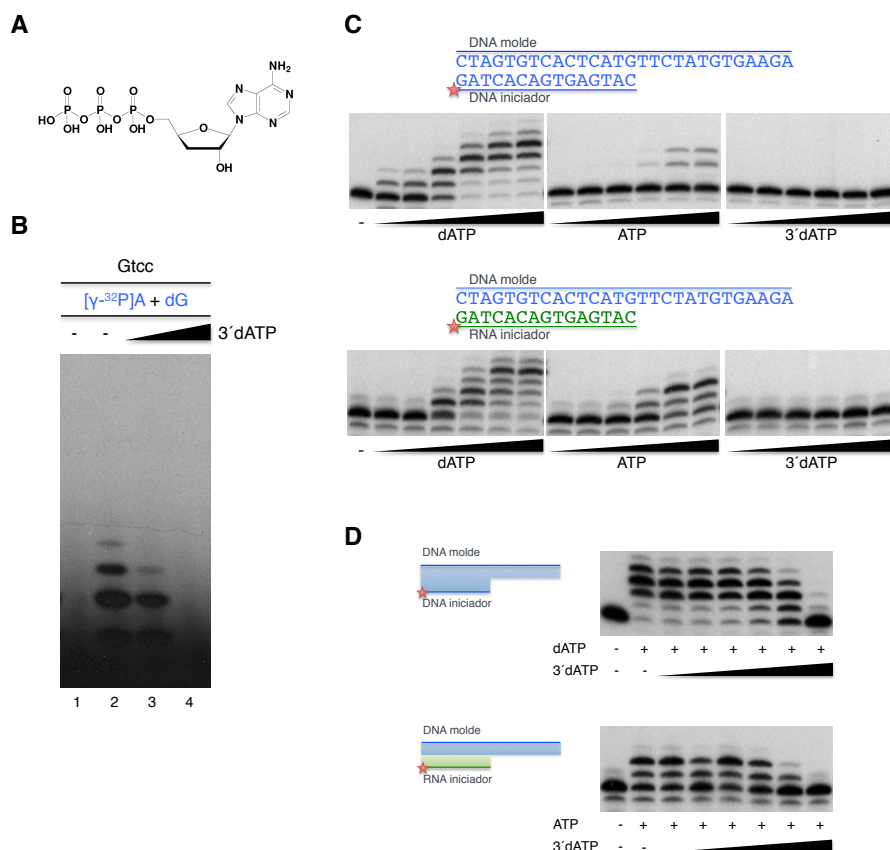


Figura 117. 3'dATP como inhibidor de las actividades de PrimPol. **A.** Representación de la molécula 3'dATP. **B.** Ensayo primasa sobre Gtcc (1 μ M) de PrimPol con [γ - 32 P]ATP (16 nM), dGTP (1 μ M) y concentraciones crecientes del inhibidor 3'dATP (100 μ M y 1 mM). **C.** Incorporación del AraCTP en comparación con dATP y ATP (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M y 1 mM) sobre una molécula de DNA de tipo molde/iniciador, siendo el iniciador de DNA (paneles superiores) o de RNA (paneles inferiores). **D.** Competición del análogo 3'dATP y el dATP o ATP. Se evaluó la inserción de dATP (10 μ M) frente a un molde/iniciador de DNA con concentraciones crecientes del 3'dATP (0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM y 1 mM). Del mismo modo se evaluó la inserción de ATP (100 μ M) frente a un molde/iniciador siendo este de RNA con concentraciones crecientes del 3'dATP (0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM y 1 mM).

7.3.3 2-Fluoro-ara-adenosina-5'-trifosfato (fludarabina)

La fludarabina (F-ara-ATP) es un análogo de nucleótido usado en el tratamiento contra cánceres del sistema circulatorio como linfomas y leucemias (Catapano et al. 1991; Rai et al. 2000) que causa la inhibición de la síntesis de DNA inhibiendo a la ribonucleótido reductasa y a las DNA polimerasas. La fludarabina es un análogo del nucleósido adenosina, que posee arabinosa en lugar de la ribosa o la desoxirribosa y contiene un flúor en la posición 2'de la adenina (Fig. 118A).

Se estudió el uso de este análogo de nucleótido durante la síntesis realizada por PrimPol. Se ensayó en actividad primasa usando M13cs como molde, dNTPs (uno de ellos marcado radiactivamente) y concentraciones crecientes de fludarabina (Fig. 118B). La fludarabina inhibió la síntesis de los iniciadores a partir de una concentración de 100 μ M. Para comprobar si PrimPol inserta la fludarabina se realizaron ensayos de polimerización sobre estructuras del tipo molde/iniciador y se comparó con la inserción de los nucleótido normales dATP o ATP. PrimPol incorporó fludarabina en un iniciador de DNA (Fig. 118C panel superior) o RNA (Fig. 118C panel inferior) con la misma eficiencia que insertó el ATP. Con la finalidad de averiguar cómo influye esta inserción de fludarabina en el transcurso de la polimerización se realizó un experimento de incorporación de los 4 dNTPs sobre un molde/iniciador de DNA, en presencia de concentraciones crecientes de fludarabina. Se pudo observar una inhibición del patrón de extensión probablemente debida a la incorporación de fludarabina (Fig. 118D).

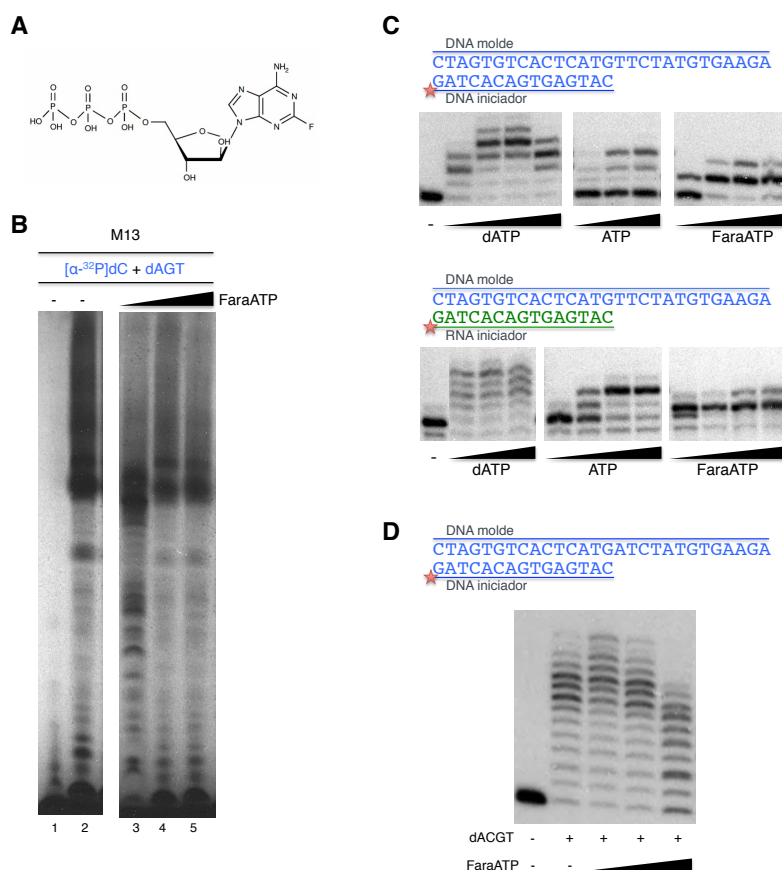


Figura 118. Efecto de la fludarabina (FaraATP) sobre las actividades de PrimPol. **A.** Representación de la molécula FaraATP. **B.** Ensayo primasa sobre M13cs (10 ng/ μ l) de PrimPol con dNTPs, dA/T/G (100 μ M) y [α - 32 P]CTP (16 nM), en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor FaraATP (10, 100 μ M y 1 mM). **C.** Incorporación de la FaraATP en comparación con dATP y ATP (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M y 1 mM) sobre una molécula de DNA de tipo molde/iniciador, siendo el iniciador de DNA (paneles superiores) o de RNA (paneles inferiores). **D.** Inhibición de la actividad DNA polimerasa de PrimPol por la adición de FaraATP (1, 10 y 100 μ M) en un ensayo con dNTPs (10 μ M).

7.3.4 2-amino-4-octadecene-1,3-diol (esfingosina)

La esfingosina es un amino alcohol que forma parte de los esfingolípidos de la membrana celular (Fig. 119A). Es empleado como agente antitumoral en leucemias donde actúa como potente inhibidor de la primasa nuclear (Tamiya-Koizumi et al. 1997), reduciendo al 50% su actividad con una concentración de 4 μ M (Simbulan et al. 1994).

Se evaluó el efecto de este inhibidor sobre la actividad primasa y polimerasa de PrimPol. Se realizó un ensayo primasa empleando el oligo específico Gtcc añadiendo [γ - 32 P]ATP, dGTP y concentraciones crecientes de esfingosina, además se realizó también un ensayo primasa en M13cs utilizando dNTPs y concentraciones crecientes del inhibidor (Fig. 119B). La esfingosina inhibió la síntesis de los iniciadores mediada por PrimPol a partir de una concentración de 100 μ M. Además se ensayó la capacidad inhibitoria de la esfingosina en un ensayo primasa sobre el molde M13cs usando dNTPs (Fig. 119C). En este caso se observa una inhibición de menor calibre que la anterior, ya que continúa habiendo actividad primasa a 1 mM de esfingosina. Por otra parte, se estudió el efecto del inhibidor durante la elongación de un iniciador existente (Fig. 119D). Se realizó un ensayo de DNA polimerasa empleando una estructura molde/iniciador de DNA, dNTPs y dosis creciente de esfingosina. La esfingosina empezó a inhibir la actividad DNA polimerasa de PrimPol en el mismo rango de concentraciones que el observado para la inhibición de la actividad primasa. En este caso fue posible observar la desaparición del molde, lo que es causado probablemente por la presencia de

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2019.05.20.256400>; this version posted May 20, 2019. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

observó una estimulación de la actividad DNA polimerasa de PrimPol, pero se vio que este efecto era indirecto, causado por el DMSO (dimetil sulfóxido) en que se diluye la droga, ya que el mismo efecto se observó al añadir únicamente el DMSO (Fig. 120C). El DMSO es un disolvente orgánico, también usado como criopreservante y como medicamento (reduce el dolor y la inflamación). Es posible que el DMSO facilite la interacción de PrimPol con los dNTPs facilitando la formación del complejo ternario (proteína-metal-nucleótido), promoviendo la formación de un complejo “activado” donde la adición del DNA resulta en una reacción mucho más eficiente.

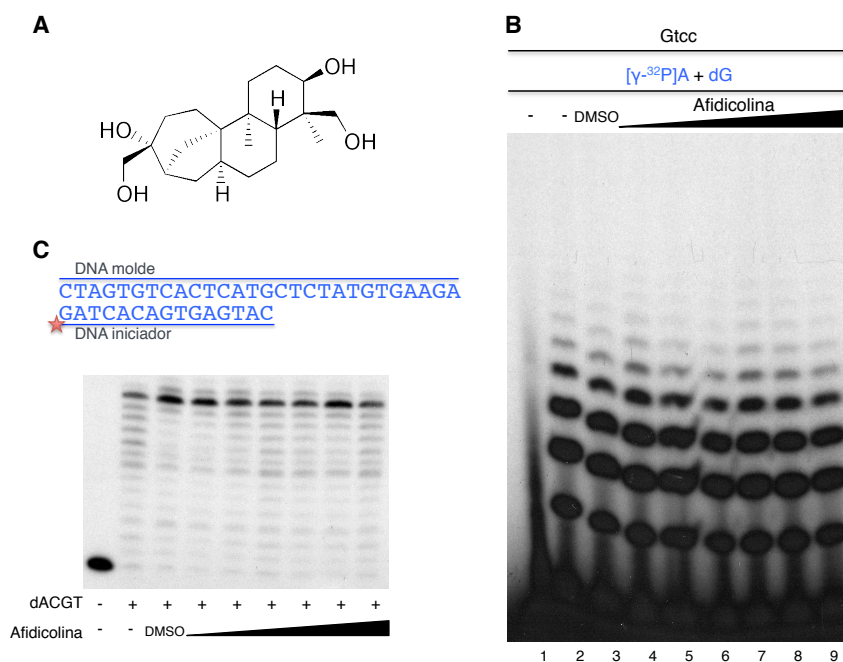


Figura 120. La afidicolina no afecta las actividades de PrimPol. **A.** Representación de la molécula afidicolina. **B.** Ensayo primasa sobre Gtcc (1 μ M) de PrimPol con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 nM), dGTP (10 μ M) y concentraciones crecientes del inhibidor afidicolina (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M y 1 mM) y un control con el DMSO equivalente en el que está diluido el inhibidor. **C.** Inhibición de la actividad DNA polimerasa de PrimPol por la adición de afidicolina (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M y 1 mM) en un ensayo con dNTPs (10 μ M), llevando el control de la adición del DMSO equivalente al que aporta la afidicolina.

7.3.6 Rifampicina

La rifampicina (Fig. 121A) es un antibiótico bactericida (Sensi et al. 1959), inhibe la RNA polimerasa bacteriana mediante su unión a la subunidad beta de esta molécula.

La rifampicina, al igual que la afidicolina (anteriormente explicada), fue ensayada sobre la primasa descubierta en mitocondria por el laboratorio de Clayton (Wong & Clayton 1985b). La resistencia de PrimPol a afidicolina es una característica más que coincide con el primer estudio bioquímico de la primasa mitocondrial, de modo que decimos probar si PrimPol también era resistente a rifampicina, como ocurría con el enzima de Clayton que este es otro de los inhibidores que Clayton empleó.

Se evaluó el efecto de la presencia de rifampicina durante la síntesis de iniciadores y la polimerización de DNA por parte de PrimPol. La rifampicina no influyó en la actividad primasa de PrimPol (Fig. 121B) ni en su actividad DNA polimerasa (Fig. 121C), aunque de nuevo observamos el efecto del DMSO que se emplea para diluir el antibiótico.

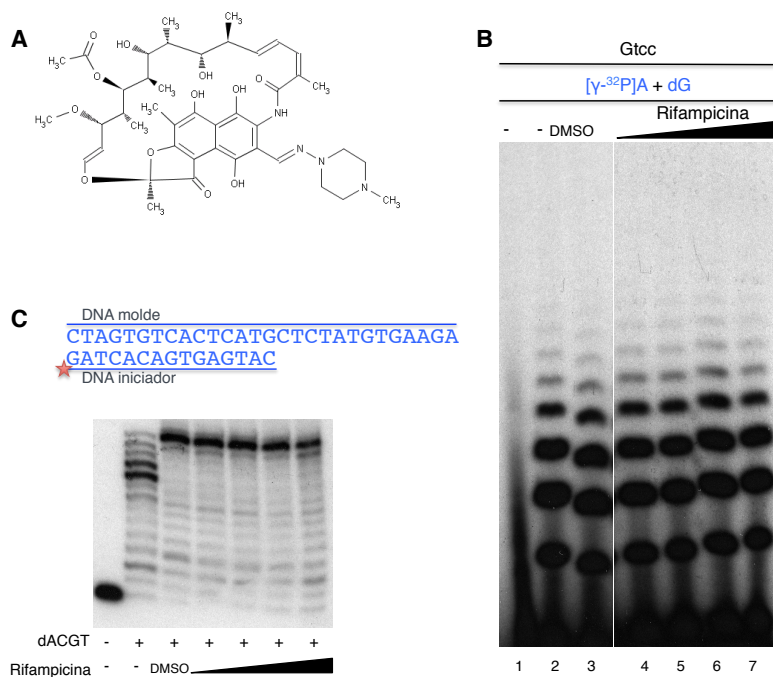


Figura 121. La rifampicina no afecta las actividades de PrimPol. **A.** Representación de la molécula rifampicina. **B.** Ensayo primasa sobre Gtcc ($1 \mu\text{M}$) de PrimPol con [γ - 32 P]ATP (16 nM), dGTP ($10 \mu\text{M}$) y concentraciones crecientes de rifampicina ($1, 10, 100 \mu\text{M}$ y 1 mM) y un control con el DMSO equivalente en el que está diluido el inhibidor. **C.** Inhibición de la actividad DNA polimerasa de PrimPol por la adición de rifampicina ($1, 10, 100 \mu\text{M}$ y 1 mM) en un ensayo con dNTPs ($10 \mu\text{M}$), llevando el control de la adición del DMSO equivalente al que aporta la rifampicina.

DISCUSIÓN

1 PrimPol, una nueva primasa y polimerasa en células eucarióticas

En el año 2005 se propuso la existencia de una nueva primasa humana (producto del gen CCDC111) que fue clasificada dentro de la superfamilia de las AEP (Primasas de Arqueas y Eucariotas), concretamente en el clado de las primasas de NCLDV-herpesvirus por poseer un dominio dedo de zinc en su extremo C-terminal, característico de estas primasas virales (Iyer et al. 2005).

1.1 PrimPol es una DNA primasa

La posibilidad de que el gen CCDC111 podría codificar para una nueva primasa en humanos, propuesta por el grupo de Aravind, fue el punto de partida del trabajo presentado en esta Tesis. Primeramente confirmamos que PrimPol tenía actividad RNA primasa, definida como un enzima que sintetiza iniciadores (primers) de RNA utilizando una molécula de DNA de cadena sencilla como molde. La longitud de los iniciadores de RNA sintetizados por las primasas oscila entre 3-20 nt, y es un parámetro característico para cada una de ellas (revisado en Frick & Richardson 2001). Por lo general existe una coordinación entre la primasa y la DNA polimerasa ya que la primera debe sintetizar iniciadores de un tamaño válido para la posterior elongación que realizará la DNA polimerasa. De hecho, cuando las primasas se ensayan *in vitro* y en ausencia de su correspondiente DNA polimerasa, sintetizan iniciadores de una gran variedad de tamaños que son múltiplo del tamaño unitario. En el caso de PrimPol no se observó este tipo de patrón durante la síntesis de los iniciadores, no acumulándose bandas de longitud determinada que pudieran indicar una preferencia de tamaño. Esta característica puede estar indicando que PrimPol no tiene que estar necesariamente acoplada a una DNA polimerasa para extender los iniciadores sintetizados por ella, ya que como se ha visto PrimPol también posee actividad polimerasa y podría ella misma llevar a cabo la extensión de los iniciadores.

En segundo lugar demostramos que una de las características más peculiares de PrimPol es la capacidad de sintetizar iniciadores utilizando desoxirribonucleótidos en ausencia total de ribonucleótidos. Por lo tanto, podemos concluir que PrimPol es también una DNA primasa.

Las primasas, al igual que las RNA polimerasas, son capaces de llevar a cabo la formación de un enlace fosfodiéster entre dos nucleósidos trifosfato. En esta reacción de formación de un dinucleótido, exclusiva para estos enzimas, el nucleótido 5 proporciona un “iniciador” válido para la adición del segundo nucleótido. El mecanismo de acción que describe la actividad primasa se puede dividir en las etapas siguientes: unión al molde, reconocimiento de secuencia, unión del nucleótido 3', unión del nucleótido 5', formación del enlace, y translocación del iniciador formado. La principal diferencia entre el mecanismo de acción de una primasa y el de una DNA polimerasa reside en que solo las primasas son capaces de utilizar un nucleótido trifosfato como iniciador, mientras que las DNA polimerasas, por problemas estéricos en su centro activo, requieren un iniciador ya formado (Fig. 122).

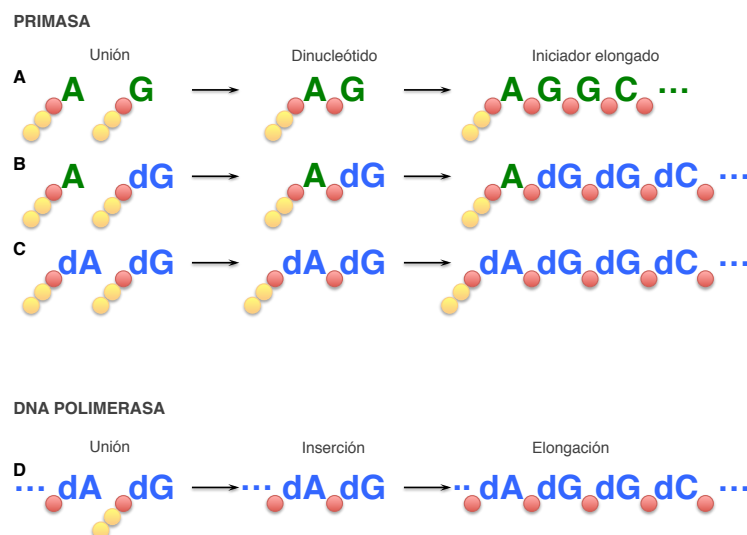


Figura 122. Diferencias en el mecanismo de acción de primasas y DNA polimerasas. Se representan los pasos de unión, formación del dinucleótido y elongación del iniciador realizados por una convencional (**A**), y una RNA/DNA primasa como PrimPol (**B** y **C**). Como comparación, se representa los pasos correspondientes (unión, inserción y elongación) realizados por una DNA polimerasa (**D**). Los ribonucleótidos se indican en verde y los desoxinucleótidos en azul

Las secuencias consideradas como sitios de reconocimiento preferente de las primasas suelen ser secuencias formadas por tres nucleótidos, que son característicos de cada primasa. De esta secuencia de tres nucleótidos, el primer nucleótido (denominado críptico) es reconocido pero no copiado y los otros dos nucleótidos de la secuencia de reconocimiento determinarán los nucleótidos con los que la primasa en cuestión inicia la síntesis. Así por ejemplo, la *dnaG* de *E. coli* reconoce la secuencia 3'GTC5' y por tanto sus iniciadores serán pppAG(N)₈₋₁₀; la primasa del fago T4 reconoce la secuencia 3'TTG5' y sus iniciadores son pppAC(N)₂₋₃. Las primasas eucarióticas tienen una cierta preferencia de secuencia pero no son tan estrictas como las procarióticas, de modo que por ejemplo la primasa de *S. cerevisiae* sintetiza iniciadores de tipo ppp(A/G)(N)₇₋₉ (Frick & Richardson 2001).

La PrimPol humana comparte con la primasa UL52 de herpesvirus humano 1 el reconocimiento preferencial de la secuencia 3'GTC 5', localizada en un entorno rico en pirimidinas. Esta secuencia y posteriores modificaciones de la misma nos fueron muy útiles para caracterizar la especificidad de PrimPol durante los primeros pasos de la formación del dinucleótido, así como para determinar la importancia del dedo de zinc en el reconocimiento del nucleótido críptico (G) contenido en la secuencia 3'GTC 5'. El estudio de la naturaleza del azúcar de los nucleótidos empleados para la síntesis del dinucleótido iniciador permitió concluir que el sitio 5' de PrimPol tiene la misma afinidad por NTPs que por dNTPs, mientras que el sitio 3' de PrimPol presenta una afinidad 100 veces mayor por dNTPs. Teniendo en cuenta que la concentración fisiológica a la que se encuentran los ribonucleótidos en la célula es unas 100 veces mayor que la de los desoxirribonucleótidos, esto hace pensar que los iniciadores sintetizados por PrimPol llevarán, con toda probabilidad, un ribonucleótido en su extremo 5'. Como ya hemos comentado, las primasas convencionales sintetizan iniciadores de RNA pero algunas primasas de arqueas y de bacterias son la excepción pudiendo usar dNTPs para fabricar iniciadores. Otras primasas como la de *Sulfolobus solfataricus* (Lao-Sirieix & Bell 2004), la de *Pyrococcus horikoshii* (Matsui et al. 2003), la de *Pyrococcus furiosus* (Bocquier et al. 2001) y el ORF904 del plásmido pRN1 de *Sulfolobus islandicus* (Beck & Lipps 2007) muestran *in vitro* que pueden utilizar también dNTPs, o incluso los prefieren para sintetizar iniciadores. Esta habilidad para incorporar dNTPs se ha observado incluso en primasas de bacteria como la DnaG de *E. coli*, aunque en este caso esto da lugar a iniciadores abortivos (Rowen & Kornberg 1978). La relevancia fisiológica de la incorporación de dNTPs en los iniciadores se desconoce.

Además de haber determinado que PrimPol reconoce de forma muy especial la secuencia 3'GTCC5' para su actividad primasa, realizamos un estudio más amplio para determinar la frecuencia con la que se forma cada uno de los posibles dinucleótidos sobre un molde heterogéneo. Agrupando los resultados de esos experimentos y partiendo de la premisa de que PrimPol necesita una G como nucleótido críptico se concluye que la secuencia mínima de reconocimiento de PrimPol es 3'G-Pi-X5' (donde Pi es una pirimidina y X cualquier nucleótido), y que los dímeros comenzarán frecuentemente por ATP o GTP. Teniendo en cuenta que los nucleótidos de mayor concentración en la célula son precisamente ATP y GTP (por su valor como moneda de cambio energético o por su actuación como cofactor), y que llegan a estar en orden de mM en lugar de μ M como los dNTPs, parece que PrimPol ha diseñado su sitio activo para sacar ventaja de la abundancia de los ribonucleótidos de purina y así favorecer el primer paso en la formación de los iniciadores, que es con toda probabilidad el paso limitante por la dificultad que supone la formación del dímero inicial.

Por último, y al igual que ocurre con la mayoría de las primasas (Frick et al. 1999; Godson et al. 1998; Kusakabe & Richardson 1997; Mustaev & Godson 1995), PrimPol puede utilizar análogos de nucleótidos como ADP, AMP-PNP y ATP γ S e incorporarlos en el extremo 5' del iniciador.

1.2 PrimPol es una polimerasa muy versátil

PrimPol demostró tener no solo actividad primasa (RNA y DNA primasa) sino que también tiene actividad DNA polimerasa convencional, extendiendo un iniciador pre-existente empleando preferentemente dNTPs. Debido a esta dualidad de actividades, la proteína producto de la expresión del gen humano CCDC111, fue denominada PrimPol (aprobado por el comité de nomenclatura de genes humanos, HUGO).

Una vez corroborado de forma exhaustiva que estas actividades son intrínsecas a PrimPol, se realizó un estudio más preciso de sus características como DNA polimerasa que pudieran sugerir su función. Una de estas características, quizás la más general, es que se trata de una DNA polimerasa distributiva, es decir, que se disocia del sustrato después de cada evento de inserción de nucleótido. Esto es una propiedad común a las DNA polimerasas que poseen una función accesorio y de síntesis limitada, al contrario que las DNA polimerasas replicativas (que son procesivas), encargadas de la síntesis de grandes trechos de DNA. Asimismo, un estudio cualitativo de la fidelidad de inserción de los nucleótidos reveló que PrimPol es una DNA polimerasa relativamente fiel, que sigue las instrucciones de una cadena molde. La medida de las constantes cinéticas determinó que PrimPol posee una K_m por dNTPs de $\approx 3 \mu$ M, lo que refleja una buena afinidad por los nucleótidos, aunque menor que la que poseen las DNA polimerasas replicativas. Por otra parte, no tiene actividad 3'-5' exonucleasa, por lo que no tiene la capacidad de corregir las posibles inserciones erróneas. Todas estas propiedades alejan a PrimPol de las DNA polimerasas replicativas, y la asemejan a las DNA polimerasas de reparación o de translesión de errores.

Al contrario que muchas DNA polimerasas de reparación, PrimPol no inserta didesoxirribonucleótidos (ddNTPs), impidiendo de esta forma que puedan actuar como terminadores de cadena durante la elongación de un iniciador ya que la ausencia del grupo 3'OH impediría la siguiente adición de nucleótidos. PrimPol no posee actividad dRP-liasa, que sería conveniente para una posible participación en el mecanismo de reparación por BER de trecho corto, pero sin embargo posee cierta capacidad de desplazamiento de banda, lo que habilitaría a PrimPol para llevar a cabo otros tipos de reacciones de reparación de DNA.

Debido a la capacidad de PrimPol de usar NTPs y dNTPs se planteó la posibilidad de que se tratase no solo de una DNA polimerasa sino que también fuese una RNA polimerasa. Cuando se evaluó la capacidad de PrimPol de extender iniciadores de DNA o RNA empleando tanto dNTPs como NTPs, se demostró que PrimPol tiene una clara preferencia por el uso de dNTPs (100 veces mayor) para elongar tanto el DNA como el RNA, pero también puede usar NTPs en ambos casos. Además,

como demostración de su gran versatilidad, PrimPol fue capaz de copiar un molde de RNA, por lo que también posee actividad reverso-transcriptasa.

Como primer análisis estructura-función de esta nueva primasa/polimerasa humana, realizamos un estudio del centro activo de PrimPol, mediante mutaciones dirigidas a aquellos residuos potencialmente catalíticos. Este estudio demostró la importancia de los residuos presuntamente implicados en la unión a metal: Asp¹¹⁴, Glu¹¹⁶ y Asp²⁸⁰, y al nucleótido entrante: His¹⁶⁹. El cambio de de estos residuos por alanina, un aminoácido pequeño y sin carga, demostró que cada uno de estos residuos resulta crucial para las actividades primasa y polimerasa, y que el mismo centro activo de PrimPol es responsable de ambas actividades. Una peculiaridad que presenta el centro activo de PrimPol es que posee un motivo DxE en lugar del convencional DxD presente en todas las enzimas implicada en la síntesis de ácidos nucleicos. Por ello se realizaron cambios de Asp por Glu y viceversa en cada uno de los tres residuos carboxílicos. Los resultados revelaron que la existencia de un aspártico en la posición 114, es decir que el motivo sea DxE y no ExE, es crítico para que se pueda coordinar el metal activador y que ocurra la catálisis. Por otra parte se demostró que el cambio del motivo DxE a DxD no repercute en la catálisis de las actividades primasa y polimerasa. Finalmente el análisis del último aspártico, Asp²⁸⁰ desveló que un cambio a glutámico en esta posición es tolerable, aunque reduce las actividades primasa y polimerasa de PrimPol.

2 Una nueva alternativa para la tolerancia al daño durante la replicación

El genoma celular está expuesto a multitud de agentes, endógenos y exógenos, que provocan la modificación de las bases del DNA o roturas en una o ambas cadenas. La mayoría de estas modificaciones son eliminadas mediante diferentes rutas de reparación pero si estos mecanismos no actúan con rapidez o el daño es causado en la fase S del ciclo celular, la maquinaria de replicación alcanzará estos daños. En estos casos se hace muy importante la existencia de mecanismos de tolerancia al daño, en los que participan DNA polimerasas especializadas capaces de sintetizar a través de estas lesiones, permitiendo que la horquilla de replicación continúe. Hasta el momento se conocen cinco DNA polimerasas de síntesis translesión (TLS) en células humanas, con funciones más o menos especializadas en tolerar un tipo concreto de daño.

2.1 PrimPol está especializada en polimerizar a través de lesiones

Debido a que las propiedades como DNA polimerasa de PrimPol (síntesis distributiva, ausencia de actividad correctora de errores, baja fidelidad de síntesis) la alejaban de un papel en replicación, se especuló sobre la posibilidad de su implicación en tolerancia al daño. Por ello, se evaluó la capacidad de PrimPol de sintetizar a través de una variedad de lesiones presentes en el DNA.

· PrimPol y la lesión 8oxoG

Como consecuencia del daño oxidativo, la base guanina se oxida dando lugar a la 8-oxoguanina (8oxoG), una de las lesiones más comunes que se pueden encontrar en el DNA. La célula eucariótica tiene mecanismos para la eliminación de estas bases oxidadas, que son muy similares al “Sistema-GO” de *E. coli*, y que comprende las proteínas MutT, MutY y MutM. En las células humanas, este sistema parece haber adquirido niveles adicionales de complejidad e involucra el BER (reparación por escisión de base), el MMR (reparación de apareamientos erróneos) y el NER (reparación por escisión de nucleótido) (revisado en Slupphaug 2003). Nuestro conocimiento del sistema-GO (Fig. 123) de humanos deriva de estudios hechos tanto con sistemas humanos como murinos. La primera línea de defensa es la eliminación del 8oxodGTP del conjunto de nucleótidos de la célula mediante la actuación de la glicosilasa MTH1 (presente en núcleo, citoplasma y mitocondria), que degrada el 8oxodGTP a su respectivo monofosfato. Si el 8oxodGTP escapa de este saneamiento de nucleótidos, puede ser incorporado en el DNA por las DNA polimerasas, y entonces entran en juego varias DNA glicosilasas. OGG1 actúa sobre DNA de doble cadena y tiene una alta especificidad para eliminar el

8oxoG apareado con dC, eliminando tanto el 8oxoG introducido por una DNA polimerasa como el producido por la oxidación de la guanina en el DNA. Existe una isoforma de OGG1 que se localiza en la mitocondria, donde los niveles de 8oxoG son relativamente altos debido a la proximidad del DNA y la cadena de fosforilación oxidativa. Recientemente se ha identificado otra proteína involucrada en la eliminación del 8oxoG apareado con dC, NEIL1. La glicosilasa OGG2 eliminará el 8oxoG apareado con A cuando este ha sido incorporado en la cadena naciente por una DNA polimerasa. No se ha visto localización de OGG2 en mitocondria, por tanto se desconoce si es posible eliminar el 8oxoG que PrimPol puede incorporar frente a una dA en el DNA mitocondrial. En los casos en los que la reparación del 8oxoG no se ha completado antes de la siguiente ronda de replicación, un dA puede ser insertado frente al 8oxoG dando lugar a transversiones dG:dC a dT:dA. En este caso es MYH (en núcleo y mitocondria) quien elimina el dA de la cadena naciente de un par dA:8G.

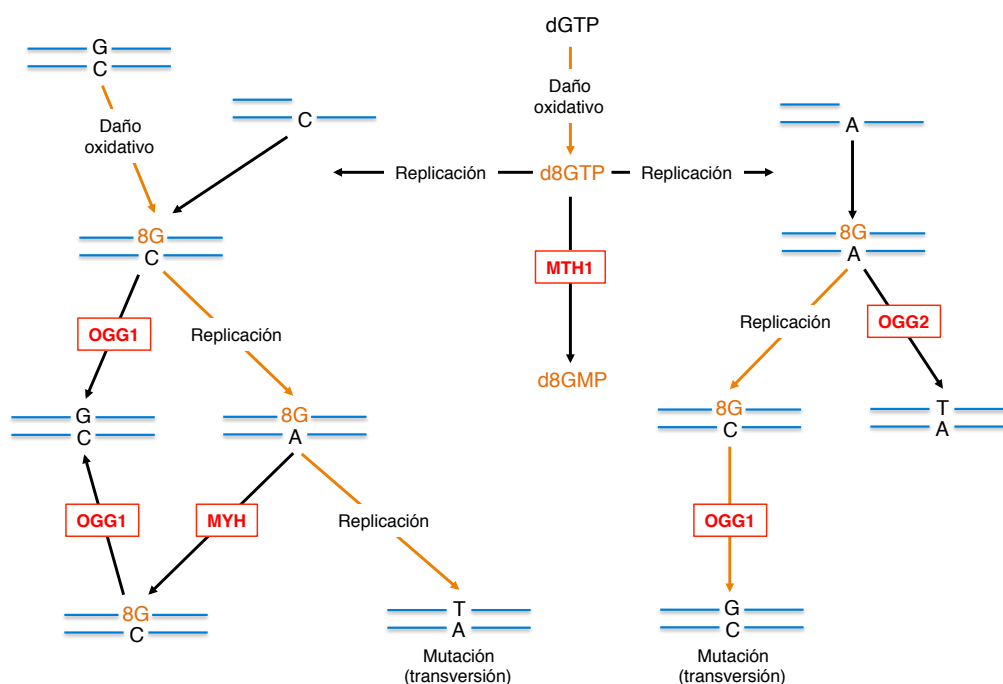


Figura 123. Sistema-GO. Mecanismos de defensa del organismo frente a los efectos mutagénicos del 8oxoG. Rutas por las que el 8oxoG presente en el molde o como nucleótido libre es insertado o copiado por las DNA polimerasas o es eliminado por glicosilasas específicas.

Como se ha demostrado en esta Tesis, PrimPol puede sintetizar a través de la lesión 8oxoG presente en el molde de DNA con la misma eficiencia que sintetiza a través de una dG no dañada. Sin embargo, el nucleótido insertado por PrimPol frente a 8oxoG puede resultar mutagénico para la célula ya que es capaz de introducir tanto dC como dA (en la misma proporción), lo que originaría transversiones dG:dC a dT:dA. Por otra parte, la oxidación también puede afectar al nucleótido libre dGTP y convertirse en 8oxodGTP. PrimPol puede utilizar 8oxodGTP e insertarlo durante la polimerización de forma muy mutagénica, ya que es insertado 100 veces mejor frente a dA que frente a dC, y al mismo nivel que la inserción de T frente a dA. Este comportamiento mutagénico de PrimPol puede llevar a transversiones dG:dC a dT:dA incluso con mayor frecuencia que cuando es copiado el 8oxoG del molde. Además hemos demostrado que PrimPol puede utilizar 8oxG como nucleótido molde críptico durante la síntesis de iniciadores, casi con la misma eficiencia que un dG no dañado. PrimPol es capaz de insertar 8oxodGTP durante la formación de los iniciadores, pero en ese caso daría lugar a iniciadores truncados ya que la inserción de 8oxodGTP bloquea de la extensión del mismo.

En resumen, PrimPol entra a formar parte del grupo de polimerasas que pueden copiar la lesión 8oxoG en el molde, contribuyendo a la formación de pares 8G:dA. La incorporación que lleva a cabo PrimPol de 8oxodGTP en el DNA preferiblemente frente a dA muestra un fuerte comportamiento mutagénico. En mitocondria este es un aspecto de gran relevancia ya que no existe OGG2 que pueda eliminar el 8oxoG incorporado frente a una dA y por tanto entraría en sucesivas rondas de replicación dando lugar a transversiones dG:dC a dT:dA.

· *PrimPol y los sitios abásicos*

Los sitios abásicos son uno de los daños del DNA más abundantes que se producen en la célula. Los sitios abásicos son localizaciones en el DNA donde no existe ni purina ni pirimidina y se pueden formar tanto de modo espontáneo como causados por agentes químicos. Los sitios abásicos que escapan de la reparación mediada por una AP endonucleasa y el BER pueden ser muy perjudiciales para la célula ya que las DNA polimerasas replicativas se bloquean en dichas lesiones debido a la ausencia de información como molde en dichos sitios. La síntesis a través de los sitios abásicos no requiere la implicación expresa de DNA polimerasas de la familia Y ya que estos sitios no provocan distorsión en la doble hélice del DNA. En su mayoría, las DNA polimerasas que logran sintetizar a través de un sitio abásico obedecen la conocida “regla de la A”, por la que insertan preferentemente un residuo de dA frente al sitio abásico (Strauss 1991). Además se ha demostrado que la posterior extensión es más eficiente si se ha insertado dA frente al sitio abásico. Por su parte, PrimPol fue capaz de sintetizar a través de uno o dos sitios abásicos seguidos, pero en ambos casos se saltó el sitio y copió el siguiente nucleótido. Este comportamiento es poco corriente entre las DNA polimerasas, ya que aunque permite tolerar los sitios abásicos, produciría mutaciones por delección de nucleótidos.

· *PrimPol y los dímeros de timina*

La luz UV provoca la formación de puentes covalentes entre pirimidinas que se encuentran adyacentes en el DNA. La mayoría de las lesiones formadas por UV son el dímero de pirimidinas ciclobutano (CPD) en un 80%, y el fotoproducto pirimidina 6-4 pirimidona (6-4PP) en un 20%. La principal ruta de reparación de las lesiones de UV es el NER, que comienza con el reconocimiento de la lesión, seguida de una incisión por ambos lados de la lesión, eliminación del oligonucleótido que contiene la lesión, relleno del hueco por una DNA polimerasa, y posterior ligación. Los dímeros de timinas que no son reparados bloquean la progresión normal de la horquilla de replicación ya que las DNA polimerasa replicativas se paran frente a estas lesiones. Las células tienen dos mecanismos para tolerar estos daños durante la replicación: mediante recombinación homóloga o empleando DNA polimerasas especializadas en llevar a cabo la síntesis a través de la lesión. PrimPol fue capaz de llevar a cabo la síntesis a través de dímeros de timina del tipo CPD, incorporando principalmente dA frente a cada una de las Ts del dímero de timinas. Esta síntesis llevada a cabo por PrimPol permite tolerar la presencia de dímeros de timinas de un modo libre de errores.

· *PrimPol y otras bases modificadas*

Existen multitud de modificaciones que pueden producirse en las bases del DNA, ya sean consecuencia de la acción de agentes externos o mecanismos endógenos como son las marcas epigenéticas. La metilación de la guanina (6meG) es producida por agentes tóxicos externos a la célula y puede ser eliminado por la acción de la metil-guanina-metil-transferasa. Si su eliminación no ocurre antes de la replicación, esta base modificada puede aparear con dC o con dT lo que provocaría una transición de tipo dG:dC a dA:dT. PrimPol fue capaz de sintetizar a través de un molde de DNA que contiene la base modificada 6meG, insertando siempre T frente a ella, lo que muestra un comportamiento mutagénico que favorecerá futuros cambios de dG:dC a dA:dT. La metilación de la citosina (5meC) es una marca epigenética que formará mayoritariamente parte de las islas CpG de los promotores de los genes ayudando a regular su expresión. Pero la modificación 5meC puede sufrir desaminación y posterior oxidación dando lugar al 5HmeU que puede aparear con

dG y con dA. Por otra parte la desaminación y oxidación de la citosina genera 5-hidroxiuracil (5HU), lo que puede provocar mutaciones de dC a dT. PrimPol tolera de forma bastante fiel casi todas estas modificaciones, insertando dG frente a 5meC, y dA frente al 5HmeU; sin embargo, PrimPol no fue capaz de copiar el 5HU y su polimerización se vio inhibida por la presencia de esta base modificada en el DNA molde.

· PrimPol y el Mn^{2+} como metal activador

Todas las actividades de PrimPol demostradas, es decir, actividad RNA y DNA primasa, actividad RNA y DNA polimerasa, y la síntesis a través de lesiones en el DNA sacan una fuerte ventaja de la presencia de iones Mn^{2+} como metal activador. Esta estimulación por iones Mn^{2+} en lugar de iones Mg^{2+} ha sido anteriormente observado en otros sistemas. Así, un buen ejemplo es la primasa humana que aumenta su actividad hasta cuatro veces en presencia de iones Mn^{2+} debido a una bajada en su K_M por los NTPs (Kirk & Kuchta 1999). El caso de algunas DNA polimerasas no es diferente, y así Pol β reduce su K_M para los dNTPs en presencia de iones Mn^{2+} (Wang et al. 1977). También se ha sugerido que otras DNA polimerasas de la misma familia X, como Pol μ y Pol λ , podrían usar Mn^{2+} incluso en condiciones fisiológicas (Domínguez et al. 2000; Blanca et al. 2003; Martin et al. 2013). Otras polimerasas de TLS como Pol ι muestran una mejor actividad en presencia de Mn^{2+} , debido a una drástica bajada en la K_M por los dNTPs (Frank & Woodgate 2007). Además, estudios recientes señalan la posibilidad de que exista un aumento intracelular del Mn^{2+} bajo condiciones de estrés oxidativo (Aguirre & Culotta 2012). Este aumento podría formar parte de una estrategia de protección antioxidante basada en la formación de complejos entre el Mn^{2+} y diferentes moléculas oxidantes que provoca la inactivación de estas, como se ha propuesto en *Deinococcus* y en levaduras (Slade & Radman 2011), pero también estaría disponible para favorecer la actividad enzimática de determinadas polimerasas como PrimPol, cuyos centros activos están adaptados a usar este activador para facilitar reacciones de síntesis en las que prima mas la eficiencia que la fidelidad.

PrimPol aporta nuevas posibilidades a la tolerancia al daño presente en el DNA ya que no se trata únicamente de otra DNA polimerasa de translesión, sino que además tiene la capacidad de iniciar la síntesis *de novo* dejando atrás la lesión en un *gap* a reparar. Uno de los aspectos mas importantes que investigaremos en el futuro es si PrimPol es capaz de reconocer el daño en la cadena molde, y de esta manera activar su función primasa. PrimPol como DNA polimerasa de translesión tiene la capacidad de realizar síntesis a través de una gran variedad de lesiones existentes en el DNA por lo que no parece estar tan especializada como sus compañeras presentes en el núcleo. Quizás esta versatilidad es importante en el contexto de su función en mitocondria, como discutiremos a continuación.

2.2 Implicación de PrimPol en la replicación del genoma mitocondrial

El mecanismo exacto mediante el cual se replica el DNA mitocondrial está todavía en debate, existiendo dos modelos principales: el asimétrico y el simétrico. Según el modelo de replicación asimétrica la síntesis del mtDNA desde el OriH es unidireccional hasta desplazar tres cuartas partes de la longitud del genoma, donde se descubre el OriL y entonces se replica esta cadena. El modelo simétrico propone una replicación bidireccional donde las hebras H y L se replican a la vez siguiendo el modelo tipo θ . Hasta el momento la única enzima capaz de iniciar la síntesis *de novo* presente en la mitocondria era la RNA polimerasa mitocondrial y la única DNA polimerasa responsable del mantenimiento y replicación del genoma mitocondrial, la DNA polimerasa gamma (Poly).

La demostración de que una fracción importante de PrimPol se encuentra localizada en la mitocondria produce necesariamente un cambio de paradigma en el contexto del mantenimiento del genoma mitocondrial. En los años 80, el grupo del Dr. David Clayton determinó la existencia de una actividad primasa (diferente a la RNA polimerasa mitocondrial), que no llegó a ser identificada genéticamente. Una vez descubierto que PrimPol se localiza en la mitocondria, se trató de demostrar

si este enzima correspondía a la primasa de Clayton, y varios experimentos parecen indicar que se trata efectivamente de la misma enzima. Así, PrimPol es capaz de sintetizar iniciadores sobre la secuencia OriL mitocondrial, con un patrón similar al que observó el grupo de Clayton; además, presenta unas características comunes como la resistencia a determinados inhibidores (rifampicina y afidicolina), la estimulación por ATP o GTP, o la sensibilidad a una concentración de NaCl mayor de 100 mM.

Sin embargo, nuestro trabajo permite proponer un novedoso papel para PrimPol sobre la base de su capacidad como polimerasa capaz de sintetizar a través de lesiones en el DNA. Este papel de PrimPol en tolerancia al daño cobra especial importancia dentro de la mitocondria, ya que el mtDNA está expuesto a altas tasas de ROS producidos por la cadena de transporte electrónico, y presenta una alta frecuencia de mutaciones como resultado de un mayor acúmulo de daño que el DNA nuclear.

Se sabe de la presencia de algunos mecanismos de reparación en la mitocondria que pueden mitigar la persistencia de daño en el DNA como es el BER, la reparación de apareamientos erróneos, la reparación de dobles roturas por recombinación homóloga y NHEJ, pero se desconoce la existencia de NER en este orgánulo. Hasta ahora, todas las funciones de síntesis de DNA asociadas a la replicación, reparación y tolerancia al daño necesarias en el DNA mitocondrial, se han atribuido a la Poly, la única DNA polimerasa identificada en mitocondria hasta el momento. La comparación de la síntesis a través de lesiones que realiza Poly con la realizada por PrimPol lleva a concluir que PrimPol tiene una mayor eficiencia en tolerar daños como 8xoG, sitios abásicos o dímeros de timinas. Además se ha demostrado una buena sinergia entre PrimPol y Poly de modo que esta última es capaz de actuar a continuación de PrimPol, utilizando los iniciadores sintetizados (o extendidos durante la translesión) por PrimPol.

Por tanto proponemos que PrimPol asistirá a Poly durante la replicación del genoma mitocondrial cuando esta resulte bloqueada o retrasada por daños en el DNA molde. La [figura 124](#) esquematiza un modelo en el que Poly es intercambiada por PrimPol para tolerar una lesión que bloquea el progreso de la DNA polimerasa replicativa. Se plantean dos vías diferentes, que pueden depender del tipo de lesión: 1) la síntesis translesiva convencional, en la que PrimPol utiliza su capacidad como polimerasa para extender el iniciador cedido por Poly; 2) la vía de re-iniciación, en la que PrimPol pone en juego su actividad primasa para iniciar la síntesis *de novo*, por delante de la lesión, dejando atrás un gap dañado que requerirá procesamiento posterior, para que de esa manera no se retrase el avance de la horquilla de replicación.

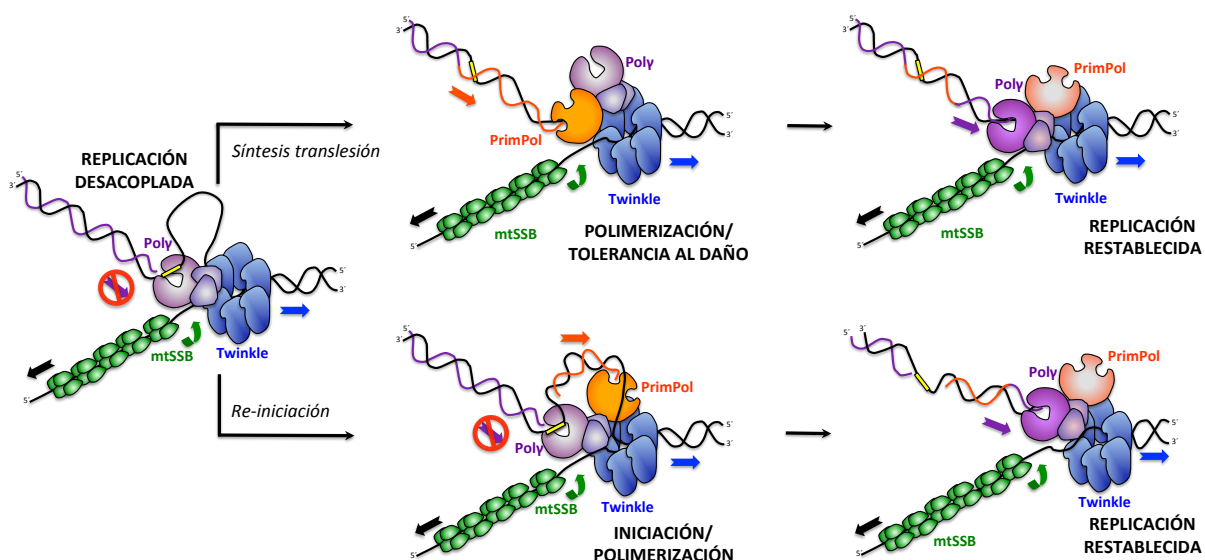


Figura 124. Modelo de función de PrimPol en la replicación del DNA mitocondrial. Esquema de dos posibles alternativas cuando Poly se para frente a una lesión en el DNA mitocondrial: 1) PrimPol puede llevar a cabo síntesis translesión convencional mediante una polimerización en la que tolera el daño. 2) PrimPol puede re-iniciar debido a su actividad primasa permitiendo a Poly continuar la replicación del DNA mitocondrial.

En colaboración con el laboratorio del Dr. Ian J. Holt (en el National Institute for Medical Research, London, UK) estudiamos el efecto de la ausencia de PrimPol sobre el mantenimiento del DNA mitocondrial. Para ello se realizó interferencia de la expresión del gen *CCDC111* en células HEK (embrionarias humanas de riñón) y posteriormente se midió el número de copia del DNA mitocondrial (en relación al DNA nuclear), observando que en ausencia de PrimPol la cantidad de DNA mitocondrial se ve reducida aproximadamente a la mitad. Se usó otra aproximación para inferir la implicación de PrimPol en la replicación del DNA mitocondrial, en la que células HEK fueron tratadas con bromuro de etidio (EtBr) para deplecionar el DNA mitocondrial y, tras la retirada del EtBr, se analizó la recuperación del DNA mitocondrial. De nuevo, en ausencia de PrimPol no se restablecieron las cantidades normales de DNA mitocondrial. Estas evidencias demostraron una función directa de PrimPol sobre el mantenimiento del genoma mitocondrial.

2.3 Implicación de PrimPol en la replicación del genoma nuclear

La presencia de PrimPol en el núcleo celular incrementa a 16 el número de DNA polimerasas humanas presentes en este compartimento celular, duplicando a la vez el número de primasas. Al igual que hemos propuesto en la mitocondria, PrimPol puede desempeñar una función en la tolerancia al daño en el DNA nuclear actuando como una DNA polimerasa de TLS convencional o generando un nuevo iniciador delante de la lesión, solventando en ambos casos el problema de avance de la horquilla de replicación.

A lo largo de esta Tesis, y en colaboración con el laboratorio del Dr. Juan Méndez (en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, España) se investigó la importancia de PrimPol en el mantenimiento del genoma nuclear, demostrándose que el silenciamiento de la expresión de PrimPol en células HeLa producía un retraso en la progresión de la fase S del ciclo celular, que se traducía a su vez en una menor proliferación de esas células. Además, mediante la técnica de “fibras de DNA” (detallada más adelante) se demostró que la falta de PrimPol produce una disminución de la velocidad de las horquillas de replicación (tanto por experimentos de interferencia, como utilizando fibroblastos embrionarios de un modelo murino PrimPol-KO disponible en nuestro laboratorio).

Hasta hace poco tiempo se asumía que cuando la horquilla de replicación encuentra un daño en el DNA que imposibilita su avance, la célula contaba con varias vías para solventar el problema. Por un lado, DNA polimerasas especializadas en translesión (familia Y) podrían asistir a la DNA polimerasa replicativa encargándose de insertar uno o dos nucleótidos frente a, o inmediatamente después, de la lesión, siendo esta vía propensa al error (Fig. 125B). Otra ruta, en este caso libre de errores, implica un cambio de molde transitorio, en el que la DNA polimerasa invade la doble cadena retrasada (ya replicada) y usa la hebra de DNA recién sintetizada como molde alternativo (Fig. 125C). Por último, la horquilla de replicación atascada puede revertir y formar una estructura como la que se visualiza en la figura 125D, cuya resolución puede dar lugar a pérdidas de información. Estas tres soluciones implican la detención de la horquilla de replicación hasta la resolución del conflicto (Fig. 125A).

Tal y como aquí se propone, PrimPol podría aportar una nueva solución para evitar retrasos en el avance de la horquilla de replicación. Gracias a su actividad primasa, PrimPol podría llevar a cabo la síntesis de un nuevo iniciador (por delante de la lesión) que permita continuar el avance de la horquilla de modo inmediato, dejando el daño en el DNA para ser resuelto en una etapa posterior, de acuerdo con los datos obtenidos por Juan Méndez, y con modelos recientes (Elvers et al. 2011).

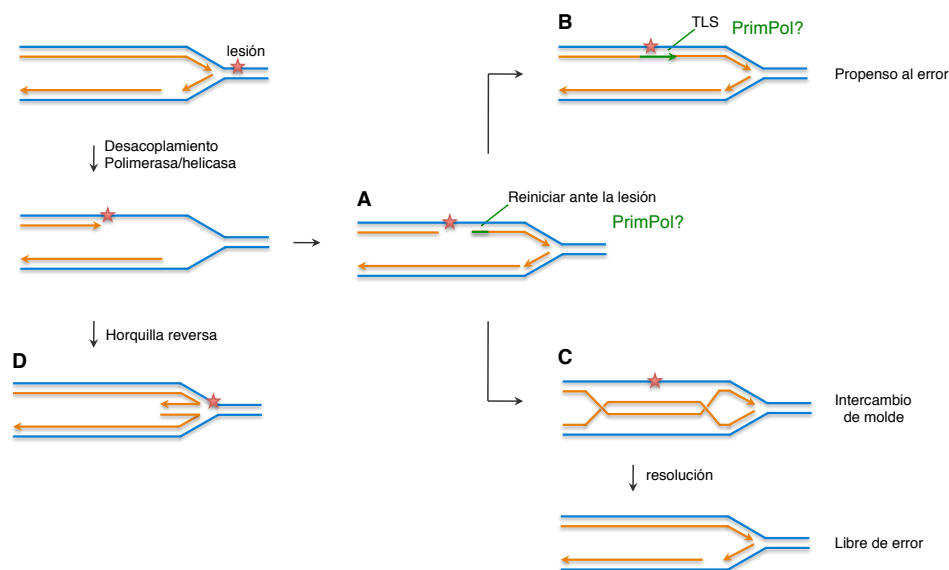


Figura 125. Modelo funcional de PrimPol durante la replicación del DNA nuclear. Cuando la horquilla de replicación alcanza una lesión en el DNA se produce un desacople entre la DNA polimerasa y la helicasa. **A.** PrimPol puede re-iniciar la síntesis evitando así la lesión. **B.** PrimPol puede llevar a cabo una síntesis a través de la lesión, como otras DNA polimeras TLS. **C.** Se puede producir un cambio de molde para sintetizar la nueva hebra sin necesidad de copiar la lesión. **D.** Finalmente, la horquilla podría revertir sobre sí misma.

3 El dominio dedo de zinc de PrimPol, consideraciones estructura-función

Al contrario que la subunidad catalítica (Prim1) de la primasa nuclear, PrimPol presenta un dominio dedo de zinc en su extremo C-terminal, similar al de las primasas de virus NCLDV (virus grandes nucleo-citoplasmáticos de DNA) compuesto por tres cisteínas y una histidina (Cys⁴¹⁹, His⁴²⁶, Cys⁴⁴⁶, Cys⁴⁵¹) que coordinan un átomo de zinc. El análisis mutacional que realizamos en esta Tesis demostró que la función del dominio dedo de zinc cobra mayor importancia durante la síntesis de los iniciadores: aunque su presencia no es crucial para la formación de los mismos sí incrementa la eficiencia con la que estos son sintetizados, y sobre todo extendidos hasta tamaños correspondientes a iniciadores funcionales, no abortivos. En contraste con el fenotipo observado para la actividad primasa, la ausencia de dedo de zinc mejora significativamente la capacidad de polimerización de PrimPol, debido a una reducción significativa (100 veces) de los valores de K_m por los dNTPs durante la polimerización. Estos resultados nos permiten postular un modelo de función del dedo de zinc de PrimPol durante la formación de los iniciadores y la extensión de los mismos. Según este modelo, y aunque el dedo de zinc no tiene un impacto global en la interacción con el DNA, parece ser importante para el reconocimiento de alguna señal en el molde (como la G críptica en el oligo Gtcc) que permite optimizar la unión de los nucleótidos iniciales, y /o la catálisis del dímero (el paso más limitante durante la síntesis de los iniciadores). Asimismo, es muy probable que el dedo de zinc continúe siendo muy importante proporcionando la estabilidad necesaria para la extensión de estos dímeros hasta convertirlos en un iniciador funcional, no abortivo. Finalmente, el dedo de zinc resulta completamente dispensable (de hecho es beneficiosa su ausencia) durante una etapa convencional de polimerización, incluso durante la translesión de daños en el DNA molde. La interpretación de estos resultados sugiere que el dedo de zinc impide una translocación más ágil durante los sucesivos ciclos de elongación como polimerasa, por lo que proponemos que el dedo de zinc podría ser movilizado durante la fase de elongación.

Existe poca información estructural sobre las primasas de la familia AEP y menos aún de sus dominios dedo de zinc ya que parece ser, en general, una estructura difícil de resolver por cristalografía de proteínas. De entre los pocos cristales de primasas que incluyen el dedo de zinc

(tanto tipo DnaG como AEPs) no parece observarse un patrón común en la localización de este dominio. En la [figura 126](#) se observa la localización del dominio dedo de zinc en varios miembros DnaG y AEP: en la DnaG del fago T4 el dedo de zinc parece ser un dominio móvil que quizás pueda acceder al entorno del centro activo, mientras que en la DnaG de la bacteria *Aquifex aeolicus* no parece móvil, encontrándose alejado del centro activo. Por otro lado, en la primasa AEP del tipo subunidad pequeña de la arquea *Pyrococcus horikoshii*, el dedo de zinc está muy cercano al centro activo, pero parece carecer de movilidad. Por último, la AEP con mayor parecido a PrimPol (desde el punto de vista de sus propiedades bioquímicas) es la PrimPol del plásmido pRN1 de la arquea *Sulfolobus islandicus*. Esta presenta un dedo de zinc, ubicado en la zona C-terminal del *core* AEP (al igual que PrimPol), que se pliega sobre el centro catalítico del enzima.

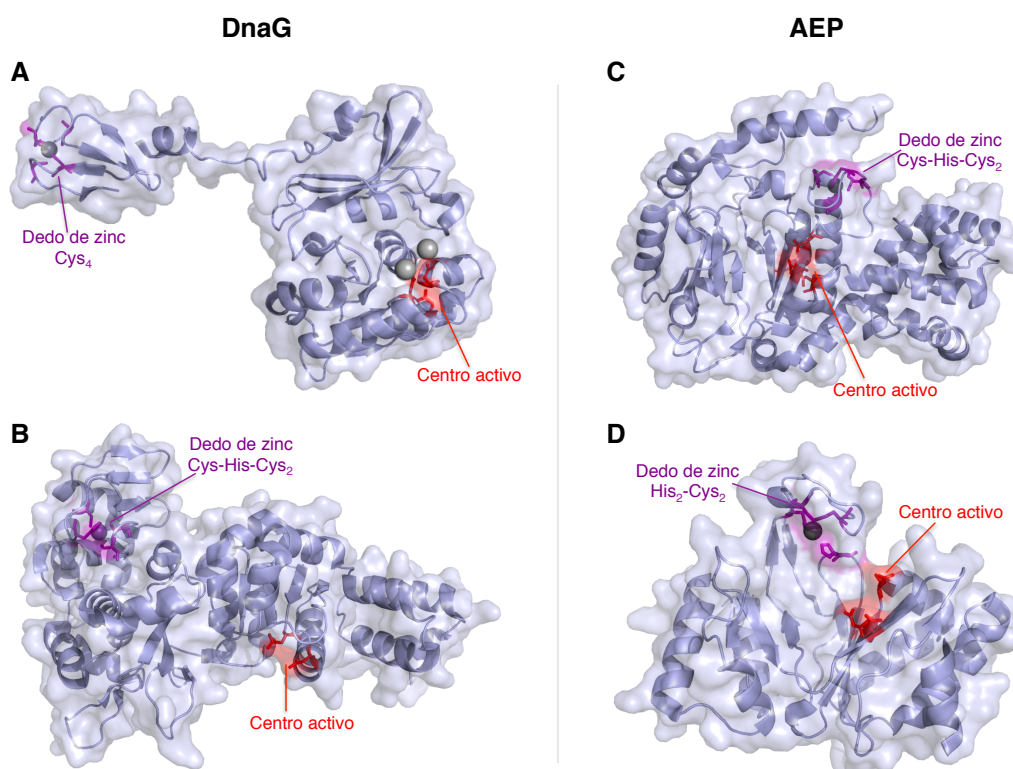


Figura 126. Estructuras tridimensionales de primasas en las que el dominio dedo de zinc es visible. Se marca en rojo el centro activo de la primasa y en morado el dominio dedo de zinc. A. Primasa dnaG del fago T7 (PDB: 1NU1). B. Primasa dnaG de la bacteria *Aquifex aeolicus* (PDB: 2AU3). C. Primasa AEP de la arquea *Pyrococcus horikoshii* (PDB: 1V34). D. Primasa AEP del plásmido pRN1 de la arquea *Sulfolobus islandicus* (PDB: 1RNI).

En base a estos modelos estructurales y a nuestro análisis mutacional, nuestra hipótesis postula que el dedo de zinc de PrimPol sea un dominio móvil, de modo que en estadios de elongación de un iniciador (pre-existente o sintetizado por PrimPol) el dedo de zinc se encuentre en una conformación abierta (inactiva) facilitada tal vez por su interacción con otras proteínas también implicadas en la replicación del DNA, como las proteínas de unión a cadena sencilla (mtSSB en mitocondria; RPA en el núcleo).

3.1 El dominio dedo de zinc de PrimPol es esencial en el re-arranque de la horquilla de replicación del DNA nuclear

Como se comentó anteriormente, en colaboración con Juan Méndez (CNIO) se realizaron medidas de la velocidad de las horquillas de replicación en ausencia de PrimPol. Para ello se utilizó un modelo

de interferencia de la expresión de la proteína PrimPol en células HeLa, y se utilizó una técnica que permite visualizar moléculas individuales (fibras) de DNA que están siendo replicadas. Para esta técnica de visualización de fibras de DNA, las células son tratadas con 5'clorodesoxiuridina (CldU) para marcar el inicio de las horquillas de replicación, y posteriormente se da otro tratamiento con 5'yododesoxiuridina (IdU), que marcará la extensión en las horquillas de replicación. Las fibra de DNA marcadas son visualizadas por microscopía obteniendo imágenes del tipo de la esquematizada en la figura 127, a partir de las cuales se puede calcular la velocidad de la horquilla de replicación y la distancia entre orígenes (y por tanto ver si la cantidad de orígenes aumenta o disminuye).

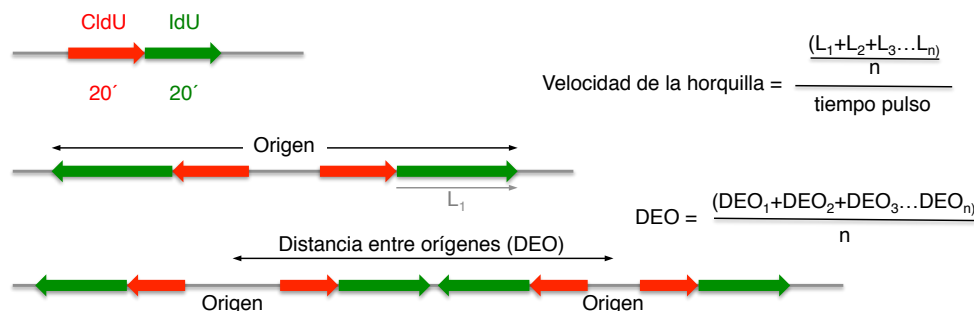


Figura 127. Representación esquemático de los experimentos de fibras con el DNA nuclear. Las células HeLa se trataron en pulsos de 20 min con los análogos CldU (en rojo) y posteriormente con IdU (en verde). Las fibras de DNA se visualizan por microscopía, pudiéndose calcular la velocidad del avance de la horquilla y la distancia entre orígenes con las fórmulas que se muestran en la figura.

En estos experimentos se observó que cuando PrimPol está ausente la velocidad de la horquilla de replicación disminuye y se disparan nuevos orígenes de replicación para compensar este hecho. Este fenotipo es rescatado con la introducción de la proteína PrimPol mediante transfección con un vector de expresión del gen CCDC111.

Para evaluar si el rescate de la velocidad normal de las horquillas dependía de la actividad primasa o polimerasa de PrimPol, utilizamos los mutantes PrimPol Δ Zn y PrimPolCC (que no poseen actividad primasa pero sí polimerasa) para transfectar las células y ver en qué grado el fenotipo era rescatado. Los mutantes en el dominio dedo de zinc de PrimPol no complementaron el fenotipo de velocidad lenta de las horquillas observado en ausencia de PrimPol. Este hecho puede ser explicado mediante dos teorías:

- Que la función que PrimPol esté desempeñando en la replicación del DNA requiera y dependa inicialmente de su actividad primasa. Según esta hipótesis cuando la horquilla de replicación se para debido a la aparición de una lesión en el DNA, PrimPol debería sintetizar un nuevo iniciador que permita la progresión de la horquilla. Esta reiniciación de la síntesis durante la replicación se hace más necesaria en la hebra líder ya que para la hebra retrasada ya existe una primasa (Pri1) encargada de sintetizar los iniciadores de cada fragmento de Okazaki. Existen evidencias de que en realidad la síntesis de la hebra líder no es completamente continua sino que puede tener nuevas iniciaciones en su transcurso, como demuestra la observación de *gaps* en esta hebra durante la replicación (Heller & Marians 2006; Elvers et al. 2011).

- Que el dominio dedo de zinc sea necesario para el reclutamiento de PrimPol al DNA que contiene la lesión, y que produjo la parada de la horquilla de replicación. Trabajos recientes demuestran el importante papel que tienen los dedos de zinc en algunas proteínas que interaccionan con el PCNA ubiquitinado. Así, cuando la horquilla de replicación se detiene por la presencia de una lesión en el DNA, se activa una respuesta por la que el PCNA (que acompaña a la horquilla interaccionando con la DNA polimerasa replicativa) se ubiquitina. La mono-ubiquitinación de PCNA moviliza a DNA polimerasas de TLS, y estimula su eficiencia de translesión. Se han descrito varios tipos de dominios

de unión a ubiquitina entre los que se encuentran dedos de zinc, como ocurre en Pol η (Acharya et al. 2010; McIntyre et al. 2013) y el efector Rad18 (que junto con Rad6 ubiquitina el PCNA) (Watanabe et al. 2004; Miyase et al. 2005) y otros componentes “sensores” del PCNA ubiquitinado, como Rad5 (Ulrich 2003), y Spartan (Centore et al. 2012).

4 Expresión de PrimPol y su posible interés como diana antitumoral

Por una parte, la función mitocondrial de PrimPol sugeriría su abundancia en aquellos tejidos con una elevada demanda metabólica, en relación con la fosforilación oxidativa. Sin embargo, la función nuclear de PrimPol sugiere su importancia en aquellos tejidos o tipos celulares más proliferativos.

A falta de experimentos directos de expresión que requerirán anticuerpos con mayor afinidad y especificidad, realizamos una búsqueda exhaustiva en bases de datos públicas que nos permitiesen evaluar la distribución y los niveles de expresión del gen CCDC111 humano. Una de estas fuentes fue la base de datos NextBio, donde se encuentran recogidos datos de expresión en tejidos y en tipos celulares, así como alteraciones de expresión relacionadas con enfermedades. Como ejemplo, la figura 128 muestra los principales tejidos donde se ha visto mayor expresión del gen CCDC111, destacando el sistema urogenital y el sistema inmune (esta expresión preferencial mayor si se trata de la especie *Mus musculus*).

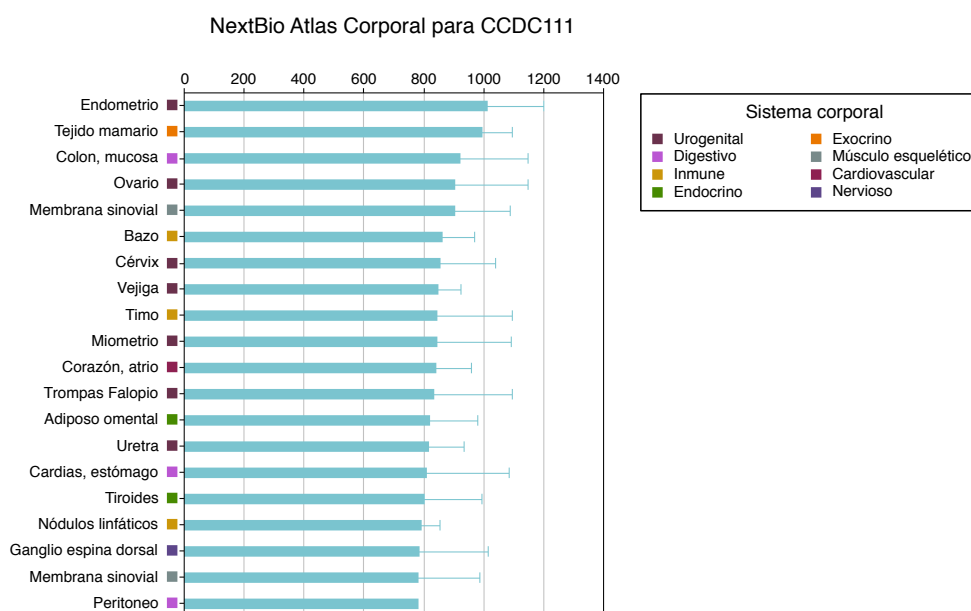


Figura 128. Representación gráfica de los niveles de expresión del gen CCDC111 en una colección de tejidos humanos. Los datos se obtuvieron de la base de datos NextBio y se eligieron los 20 tejidos donde la expresión de PrimPol es mayor.

También se realizó una búsqueda de expresión alterada de PrimPol relacionada con enfermedades. Dentro las enfermedades donde PrimPol se encuentra sobreexpresada destacan las lesiones cardíacas, insuficiencia cardíaca, isquemia, etc. También se observó sobreexpresión de PrimPol en procesos cancerosos relacionados con el sistema inmune, como linfomas y leucemias. Por el contrario, en otros cánceres como el cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de próstata o de ovario (entre otros), la expresión de PrimPol se encuentra regulada a la baja.

Es bien conocido que las DNA polimerasas de translesión juegan un papel muy relevante en el establecimiento de fenotipo tumoral, ya que permiten elevadas cuotas de estrés replicativo, característico de muchos tipos de tumores. Dado que podría llegar a darse alguna correlación entre la

sobreexpresión de PrimPol y el desarrollo de determinados cánceres, la inhibición de esta primasa/polimerasa humana podría ser una buena estrategia en el tratamiento contra estas enfermedades. Así, en un estudio muy preliminar, se decidió probar una variedad de inhibidores y agentes antitumorales conocidos con el fin de observar el posible efecto que puedan tener sobre PrimPol.

PrimPol fue capaz de tolerar la lesión 5FU, que puede ser incorporada al DNA como efecto de su empleo como agente antitumoral, así como incorporar AraCTP (análogo de nucleótido empleado como antitumoral en el tratamiento de la leucemia mielógena) y Fludarabina (análogo de nucleótido empleado en el tratamiento de leucemias y linfomas), inhibiendo ambos antitumorales su capacidad de síntesis. Por el contrario, la cordicepina (3'dATP), que es un terminador de cadena, no tuvo efecto sobre las actividades de síntesis de PrimPol, al igual que la esfingosina (que por el contrario es un fuerte inhibidor de la primasa nuclear), la afidicolina (inhibidor de las DNA polimerasas replicativas) y la rifampicina (inhibidor de las RNA polimerasas).

En resumen, aquí se presenta la identificación y caracterización de una nueva DNA primasa/polimerasa presente en células humanas que posee la habilidad única de iniciar la síntesis usando dNTPs y una marcada capacidad de realizar síntesis translesión. PrimPol podría asistir a las polimerasas replicativas (Pol γ en mitocondria y Pol ϵ y Pol δ en núcleo) ante lesiones en el molde, no solo como polimerasa de translesión, sino que podría rescatar la horquilla de replicación mediante la síntesis de un nuevo iniciador por delante de la lesión. La tolerancia a daños en el DNA es un aspecto muy importante en la fisiología de células y tejidos proliferativos, pero sin duda lo es aún mas en situaciones patológicas de estrés replicativo como ocurre en algunos tipos de tumores. La importancia de PrimPol en el desarrollo tumoral, y su impacto en la mutagénesis del DNA mitocondrial son dos aspectos que sin duda serán objeto de futuras investigaciones sobre esta novedosa enzima.

CONCLUSIONES

1. El gen humano CCDC111 codifica para una nueva primasa perteneciente a la superfamilia de las AEP (Primasas de Arqueas y Eucariotas). Ccdc111 no solo es capaz de utilizar ribonucleótidos, como las primasas convencionales, sino que también es capaz de usar desoxirribonucleótidos.
2. La proteína humana ccdc111, en su acción como primasa, tiene la misma preferencia por ribo- o desoxirribonucleótidos en su sitio de iniciación o sitio 5', mientras que la preferencia es 100 veces mayor para los desoxirribonucleótidos en el sitio de elongación o sitio 3'.
3. La proteína humana ccdc111 reconoce preferencialmente determinadas secuencias para iniciar la síntesis. El triplete favorito como molde de iniciación se puede definir como 3' G-Pir-N 5', donde Pir es una pirimidina y N es cualquier nucleótido.
4. La proteína humana ccdc111 posee actividad DNA y RNA polimerasa. Debido a esta dualidad de funciones primasa y polimerasa, ccdc111 ha pasado a llamarse PrimPol, nombre aceptado por el Comité de Nomenclatura de Genes Humanos (HUGO).
5. PrimPol tiene capacidad de sintetizar a través de diferentes daños en el DNA como la base oxidada 8oxoGuanina, los sitios abásicos, o los dímeros de timinas, lo que sugiere un papel en tolerancia al daño durante la replicación del DNA.
6. Los residuos Aspártico 114, Glutámico 116 y Aspártico 280 son esenciales para las actividades primasa y polimerasa de PrimPol, formando parte del centro activo como ligandos de los iones metálicos necesarios para la catálisis. El residuo Histidina 169 es igualmente esencial para ambas actividades primasa y polimerasa de PrimPol. Este residuo podría estar implicado tanto en la coordinación del cofactor metálico como en la interacción con el nucleótido entrante.
7. PrimPol posee un dominio dedo de zinc en su extremo C-terminal que es esencial para la actividad primasa, probablemente participando en el reconocimiento de la Guanina que actúa como nucleótido críptico en la secuencia de reconocimiento en el molde.
8. La ausencia del dedo de zinc mejora la actividad polimerasa de PrimPol debido a un aumento de la afinidad por los nucleótidos, lo que sugiere que este dominio podría ser movilizado *in vivo* para permitir una mejor polimerización a través de daños en el DNA molde.
9. Anticuerpos producidos contra la proteína humana PrimPol permitieron identificar su localización subcelular en citoplasma, núcleo y mitocondria. Se ha demostrado la sinergia funcional entre PrimPol y la DNA polimerasa replicativa del DNA mitocondrial, Poly, de modo que los iniciadores sintetizados por PrimPol son eficientemente extendidos por Poly.
10. El modelo derivado de estos primeros estudios sobre PrimPol sugiere su importante papel en la reiniciación de horquillas de replicación colapsadas por la presencia de daño en el DNA. Este modelo es igualmente válido para la replicación de DNA nuclear y mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, N. et al., 2010. DNA polymerase eta lacking the ubiquitin-binding domain promotes replicative lesion bypass in humans cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), pp.10401–5.
- Aguirre, J.D. & Culotta, V.C., 2012. Battles with iron: manganese in oxidative stress protection. *The Journal of biological chemistry*, 287(17), pp.13541–8.
- Akbari, M. et al., 2008. Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis. *DNA repair*, 7(4), pp.605–16.
- Aravind, L. et al., 2002. Trends in protein evolution inferred from sequence and structure analysis. *Current opinion in structural biology*, 12(3), pp.392–9.
- Aravind, L. & Koonin, E V, 2001. Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome research*, 11(8), pp.1365–74.
- Aravind, L., Leipe, D D & Koonin, E V, 1998. Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic acids research*, 26(18), pp.4205–13.
- Arnold, J.J. et al., 2012. Human mitochondrial RNA polymerase: structure-function, mechanism and inhibition. *Biochimica et biophysica acta*, 1819(9-10), pp.948–60.
- Augustin, M.A., Huber, R. & Kaiser, J.T., 2001. Crystal structure of a DNA-dependent RNA polymerase (DNA primase). *Nature structural biology*, 8(1), pp.57–61.
- Bacman, S.R., Williams, S.L. & Moraes, C.T., 2009. Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after in vivo induction of multiple double-strand breaks. *Nucleic acids research*, 37(13), pp.4218–26.
- Bebenek, B.K. & Kunkel, Thomas A, 2004. FUNCTIONS OF DNA POLYMERASES. *Advances in Protein Chemistry*, 69, pp.137–165.
- Bebenek, K et al., 2001. 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5511), pp.2156–9.
- Beck, K. & Lipps, G., 2007. Properties of an unusual DNA primase from an archaeal plasmid. *Nucleic acids research*, 35(17), pp.5635–45.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N., 1997. Oxidative decay of DNA. *The Journal of biological chemistry*, 272(32), pp.19633–6.
- Beckman, R.A., Mildvan, A.S. & Loeb, L.A., 1985. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry*, 24(21), pp.5810–7.
- Bell, D.E. & Fridland, A., 1980. Mode of action of 9-beta-D-arabinosyladenine and 1-beta-D-arabinosylcytosine on DNA synthesis in human lymphoblasts. *Biochimica et biophysica acta*, 606(1), pp.57–66.
- Bender, J., 2004. DNA methylation and epigenetics. *Annual review of plant biology*, 55, pp.41–68.

- Bernad, A et al., 1989. A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*, 59(1), pp.219–28.
- Berneburg, M. et al., 2006. “To repair or not to repair - no longer a question”: repair of mitochondrial DNA shielding against age and cancer. *Experimental dermatology*, 15(12), pp.1005–15.
- Bernstein, J.A. & Richardson, C C, 1988. A 7-kDa region of the bacteriophage T7 gene 4 protein is required for primase but not for helicase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(2), pp.396–400.
- Biswas, N. & Weller, S K, 1999. A mutation in the C-terminal putative Zn²⁺ finger motif of UL52 severely affects the biochemical activities of the HSV-1 helicase-primase subcomplex. *The Journal of biological chemistry*, 274(12), pp.8068–76.
- Blanca, G. et al., 2003. Human DNA polymerase lambda diverged in evolution from DNA polymerase beta toward specific Mn(++) dependence: a kinetic and thermodynamic study. *Biochemistry*, 42(24), pp.7467–76.
- Bocquier, a a et al., 2001. Archaeal primase: bridging the gap between RNA and DNA polymerases. *Current biology : CB*, 11(6), pp.452–6.
- Bohr, Vilhelm A, 2002. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free radical biology & medicine*, 32(9), pp.804–12.
- Bohr, Vilhelm A., 2002. Serial Review : Oxidative DNA Damage and Repair Repair of Oxidative DNA Damage in Nuclear and Mitochondrial DNA , and some Changes with Aging in Mammlaim Cells. *Free radical biology & medicine*, 32(9), pp.804–812.
- Braithwaite, D.K. & Ito, J., 1993. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic acids research*, 21(4), pp.787–802.
- Le Breton, M. et al., 2007. The heterodimeric primase from the euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*: a multifunctional enzyme for initiation and repair? *Journal of molecular biology*, 374(5), pp.1172–85.
- Budzowska, M. & Kanaar, R., 2009. Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell biochemistry and biophysics*, 53(1), pp.17–31.
- Burgers, P.M. et al., 2001. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *The Journal of biological chemistry*, 276(47), pp.43487–90.
- Carrodegua, J.A. et al., 2001. Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer. *Molecular cell*, 7(1), pp.43–54.
- Catapano, C. V, Chandler, K.B. & Fernandes, D.J., 1991. Inhibition of primer RNA formation in CCRF-CEM leukemia cells by fludarabine triphosphate. *Cancer research*, 51(7), pp.1829–35.
- Cavanaugh, N. a & Kuchta, Robert D, 2009. Initiation of new DNA strands by the herpes simplex virus-1 primase-helicase complex and either herpes DNA polymerase or human DNA polymerase alpha. *The Journal of biological chemistry*, 284(3), pp.1523–32.
- Centore, R.C. et al., 2012. Spartan/C1orf124, a reader of PCNA ubiquitylation and a regulator of UV-induced DNA damage response. *Molecular cell*, 46(5), pp.625–35.

- Chaudhuri, N.K., Montag, B.J. & Heidelberger, C., 1958. Studies on fluorinated pyrimidines. III. The metabolism of 5-fluorouracil-2-C14 and 5-fluoroorotic-2-C14 acid *in vivo*. *Cancer research*, 18(3), pp.318–28.
- Chemnitz Galal, W. et al., 2012. Formation of dAMP-glycerol and dAMP-Tris derivatives by *Thermococcus kodakaraensis* DNA primase. *The Journal of biological chemistry*, 287(20), pp.16220–9.
- Chen, J. et al., 2008. DNA oligonucleotides with A, T, G or C opposite an abasic site: structure and dynamics. *Nucleic acids research*, 36(1), pp.253–62.
- Chen, Y. et al., 2007. A mutation in the human herpes simplex virus type 1 UL52 zinc finger motif results in defective primase activity but can recruit viral polymerase and support viral replication efficiently. *Journal of virology*, 81(16), pp.8742–51.
- Choi, J.-Y. et al., 2010. Translesion Synthesis Across Abasic Lesions by Human B- family and Y- family DNA Polymerases α , δ , η , ι , κ , and REV1. *Journal of molecular biology*, 404(1), pp.34–44.
- Clayton, D.A., 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annual review of cell biology*, 7, pp.453–78.
- Clayton, D.A., Doda, J.N. & Friedberg, E C, 1974. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(7), pp.2777–81.
- Cotterill, S., Chui, G. & Lehman, I.R., 1987. DNA polymerase-primase from embryos of *Drosophila melanogaster*. DNA primase subunits. *The Journal of biological chemistry*, 262(33), pp.16105–8.
- Cuniasse, P. et al., 1990. The abasic site as a challenge to DNA polymerase. A nuclear magnetic resonance study of G, C and T opposite a model abasic site. *Journal of molecular biology*, 213(2), pp.303–14.
- Delarue, M. et al., 1990. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein engineering*, 3(6), pp.461–7.
- DePamphilis, M.L. & Bell, S.D., 2010. *Genome duplication*, London & New York: Garland Science.
- Dogliotti, E. et al., 2001. The mechanism of switching among multiple BER pathways. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 68, pp.3–27.
- Domínguez, O et al., 2000. DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *The EMBO journal*, 19(7), pp.1731–42.
- Durai, S. et al., 2005. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic acids research*, 33(18), pp.5978–90.
- Elvers, I. et al., 2011. UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts. *Nucleic acids research*, 39(16), pp.7049–57.
- Estey, E. et al., 1987. Variables predicting response to high dose cytosine arabinoside therapy in patients with refractory acute leukemia. *Leukemia*, 1(8), pp.580–3.

- Forterre, P., 1999. Displacement of cellular proteins by functional analogues from plasmids or viruses could explain puzzling phylogenies of many DNA informational proteins. *Molecular microbiology*, 33(3), pp.457–65.
- Frank, Ekaterina G & Woodgate, Roger, 2007. Increased catalytic activity and altered fidelity of human DNA polymerase ϵ in the presence of manganese. *The Journal of biological chemistry*, 282(34), pp.24689–96.
- Frick, D N, Kumar, S. & Richardson, C C, 1999. Interaction of ribonucleoside triphosphates with the gene 4 primase of bacteriophage T7. *The Journal of biological chemistry*, 274(50), pp.35899–907.
- Frick, David N & Richardson, Charles C, 2001. DNA primases. *Annual review of biochemistry*, 70, pp.39–80.
- Friedberg, E C, Fischhaber, P L & Kisker, C, 2001. Error-prone DNA polymerases: novel structures and the benefits of infidelity. *Cell*, 107(1), pp.9–12.
- Friedberg, E. et al., 2006. *DNA Repair And Mutagenesis*. 2nd ed., Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press.
- Friedberg, Errol C, 2011. Nucleotide excision repair of DNA: The very early history. *DNA repair*, 10(7), pp.668–72.
- Fukui, H. & Moraes, C.T., 2009. Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Human molecular genetics*, 18(6), pp.1028–36.
- Furth, J.J. & Cohen, S.S., 1968. Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9-beta-d-arabinofuranoxyladenine. *Cancer research*, 28(10), pp.2061–7.
- Fusté, J.M. et al., 2010. Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Molecular cell*, 37(1), pp.67–78.
- García-Díaz, M et al., 2001. Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase λ : a possible role in base excision repair. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), pp.34659–63.
- García-Díaz, Miguel et al., 2002. DNA polymerase λ , a novel DNA repair enzyme in human cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(15), pp.13184–91.
- Gellert, M., 2002. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annual review of biochemistry*, 71, pp.101–32.
- Godson, G.N., Mustaev, A.A. & Sun, W., 1998. ATP cross-linked to *Escherichia coli* single-strand DNA-binding protein can be utilized by the catalytic center of primase as initiating nucleotide for primer RNA synthesis on phage G4oric template. *Biochemistry*, 37(11), pp.3810–7.
- Goodman, Myron F, 2002. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annual review of biochemistry*, 71, pp.17–50.
- Gottlieb, T.M. & Jackson, S.P., 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72(1), pp.131–42.

- Gozalbo-López, B. et al., 2009. A role for DNA polymerase mu in the emerging DJH rearrangements of the postgastrulation mouse embryo. *Molecular and cellular biology*, 29(5), pp.1266–75.
- Graham, F.L. & Whitmore, G.F., 1970. Studies in mouse L-cells on the incorporation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine into DNA and on inhibition of DNA polymerase by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate. *Cancer research*, 30(11), pp.2636–44.
- Graziewicz, M.A., Longley, Matthew J & Copeland, William C, 2006. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chemical reviews*, 106(2), pp.383–405.
- Griep, M.A. & Lokey, E.R., 1996. The role of zinc and the reactivity of cysteines in *Escherichia coli* primase. *Biochemistry*, 35(25), pp.8260–7.
- Guo, C. et al., 2003. Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis. *The EMBO journal*, 22(24), pp.6621–30.
- Halgasova, N., Mesarosova, I. & Bukovska, G., 2012. Identification of a bifunctional primase-polymerase domain of corynephage BFK20 replication protein gp43. *Virus research*, 163(2), pp.454–60.
- Hanes, J.W., Thal, D.M. & Johnson, K. a, 2006. Incorporation and replication of 8-oxo-deoxyguanosine by the human mitochondrial DNA polymerase. *The Journal of biological chemistry*, 281(47), pp.36241–8.
- Haracska, Lajos, Prakash, Louise & Prakash, Satya, 2002. Role of human DNA polymerase kappa as an extender in translesion synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), pp.16000–5.
- Haracska, Lajos, Prakash, Satya & Prakash, Louise, 2003. Yeast DNA Polymerase ζ Is an Efficient Extender of Primer Ends Opposite from 7, 8-Dihydro-8-Oxoguanine and O 6 -Methylguanine. *Molecular and cellular biology*, 23(4), pp.1453–1459.
- Harman, D., 1972. The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, 20(4), pp.145–7.
- Heidelberger, C. et al., 1957. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561), pp.663–6.
- Helbock, H.J. et al., 1998. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), pp.288–93.
- Heller, R.C. & Marians, K.J., 2006. Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature*, 439(7076), pp.557–62.
- Hines, J.C. & Ray, D.S., 2010. A mitochondrial DNA primase is essential for cell growth and kinetoplast DNA replication in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and cellular biology*, 30(6), pp.1319–28.
- Hines, J.C. & Ray, D.S., 2011. A second mitochondrial DNA primase is essential for cell growth and kinetoplast minicircle DNA replication in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic cell*, 10(3), pp.445–54.
- Hoegge, C. et al., 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419(6903), pp.135–41.

- Holmes, A.M. et al., 1985. Initiation of DNA synthesis by the calf thymus DNA polymerase-primase complex. *The Journal of biological chemistry*, 260(19), pp.10840–6.
- Holt, I J, Lorimer, H.E. & Jacobs, H.T., 2000. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, 100(5), pp.515–24.
- Hopkins, R.L. & Goodman, M F, 1980. Deoxyribonucleotide pools, base pairing, and sequence configuration affecting bromodeoxyuridine- and 2-aminopurine-induced mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(4), pp.1801–5.
- Hudson, E.K. et al., 1998. Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free radical research*, 29(6), pp.573–9.
- Hübscher, U. & Maga, G., 2011. DNA replication and repair bypass machines. *Current opinion in chemical biology*, 15(5), pp.627–35.
- Ilyina, T. V & Koonin, E V, 1992. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic acids research*, 20(13), pp.3279–85.
- Ito, N. et al., 2003. Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* DNA primase-UTP complex: implications for the mechanism of primer synthesis. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 8(12), pp.913–23.
- Iyer, L.M. et al., 2005. Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members. *Nucleic acids research*, 33(12), pp.3875–96.
- Izuta, S. et al., 1996. 3'-Deoxyribonucleotides inhibit eukaryotic DNA primase. *Journal of biochemistry*, 119(6), pp.1038–44.
- Jang, Y.H. et al., 2002. First principles calculations of the tautomers and pK(a) values of 8-oxoguanine: implications for mutagenicity and repair. *Chemical research in toxicology*, 15(8), pp.1023–35.
- Johnson, R E, Washington, M T, et al., 2000. Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*, 406(6799), pp.1015–9.
- Johnson, R E et al., 1999. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5425), pp.263–5.
- Johnson, R E, Prakash, S & Prakash, L, 2000. The human DINB1 gene encodes the DNA polymerase Poltheta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), pp.3838–43.
- Johnson, S.K., Bhattacharyya, S. & Griep, M.A., 2000. DnaB helicase stimulates primer synthesis activity on short oligonucleotide templates. *Biochemistry*, 39(4), pp.736–44.
- Juárez, R. et al., 2006. A specific loop in human DNA polymerase mu allows switching between creative and DNA-instructed synthesis. *Nucleic acids research*, 34(16), pp.4572–82.
- Kabbinavar, F. et al., 2003. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(1), pp.60–5.

- Kaguni, L.S., 2004. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annual review of biochemistry*, 73, pp.293–320.
- Kamer, G. & Argos, P., 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic acids research*, 12(18), pp.7269–82.
- Karanjawala, Z.E. et al., 2002. Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. *Current biology: CB*, 12(5), pp.397–402.
- Kasiviswanathan, R. et al., 2012. Human mitochondrial DNA polymerase γ exhibits potential for bypass and mutagenesis at UV-induced cyclobutane thymine dimers. *The Journal of biological chemistry*, 287(12), pp.9222–9.
- Keating, M.J. et al., 1982. Improved prospects for long-term survival in adults with acute myelogenous leukemia. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 248(19), pp.2481–6.
- Kirk, B.W. & Kuchta, R D, 1999. Human DNA primase: anion inhibition, manganese stimulation, and their effects on in vitro start-site selection. *Biochemistry*, 38(31), pp.10126–34.
- Koonin, E V et al., 2000. Bacterial homologs of the small subunit of eukaryotic DNA primase. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2(4), pp.509–12.
- Kornberg, A. & Baker, T., 1992. *DNA Replication* 2nd ed., San Francisco: Freeman.
- Kouroussis, C. et al., 2002. Oxaliplatin with high-dose leucovorin and infusional 5-fluorouracil in irinotecan-pretreated patients with advanced colorectal cancer (ACC). *American journal of clinical oncology*, 25(6), pp.627–31.
- Kretschmar, A. et al., 2000. Weekly 24-hour infusion of high-dose 5-fluorouracil plus folinic acid in combination with mitomycin C for the treatment of advanced gastric cancer. *Oncology*, 59((1)), pp.14–7.
- Kreutzer, D.A. & Essigmann, J.M., 1998. Oxidized, deaminated cytosines are a source of C \rightarrow T transitions *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), pp.3578–82.
- Kuchta, Robert D & Stengel, G., 2010. Mechanism and evolution of DNA primases. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(5), pp.1180–9.
- Kufe, D.W. et al., 1980. Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA. *The Journal of biological chemistry*, 255(19), pp.8997–900.
- Kunkel, T a, 2009. Evolving views of DNA replication (in)fidelity. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 74, pp.91–101.
- Kunkel, T a, 1985. The mutational specificity of DNA polymerases-alpha and -gamma during in vitro DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 260(23), pp.12866–74.
- Kunkel, Thomas A & Bebenek, Katarzyna, 2000. Dna Replication Fidelity. , pp.497–529.
- Kusakabe, T & Richardson, C C, 1997. Gene 4 DNA primase of bacteriophage T7 mediates the annealing and extension of ribo-oligonucleotides at primase recognition sites. *The Journal of biological chemistry*, 272(19), pp.12446–53.

- Kusakabe, Takahiro & Richardson, Charles C, 1996. The Role of the Zinc Motif in Sequence Recognition by DNA Primases. *The Journal of biological chemistry*, 271(32), pp.19563–19570.
- Lao-Sirieix, S. & Bell, S.D., 2004. The heterodimeric primase of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* possesses DNA and RNA primase, polymerase and 3'-terminal nucleotidyl transferase activities. *Journal of molecular biology*, 344(5), pp.1251–63.
- Ledwith, B.J., Manam, S. & Van Tuyle, G.C., 1986. Characterization of a DNA primase from rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 261(14), pp.6571–7.
- Lee, J.W. et al., 2003. Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer research*, 63(1), pp.22–4.
- Lehmann, A.R., 2000. Replication of UV-damaged DNA: new insights into links between DNA polymerases, mutagenesis and human disease. *Gene*, 253(1), pp.1–12.
- Lehmann, A.R. et al., 1975. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), pp.219–23.
- Leipe, D D, Aravind, L. & Koonin, E V, 1999. Did DNA replication evolve twice independently? *Nucleic acids research*, 27(17), pp.3389–401.
- Li, C. & Englund, P.T., 1997. A mitochondrial DNA primase from the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *The Journal of biological chemistry*, 272(33), pp.20787–92.
- Lieber, M.R., 2008. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of biological chemistry*, 283(1), pp.1–5.
- Lim, S.E., Longley, M J & Copeland, W C, 1999. The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *The Journal of biological chemistry*, 274(53), pp.38197–203.
- Lindahl, T., 2001. Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 68, pp.xvii–xxx.
- Ling, H. et al., 2001. Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell*, 107(1), pp.91–102.
- Lipps, G. et al., 2003. A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *The EMBO journal*, 22(10), pp.2516–25.
- Lipps, G. et al., 2004. Structure of a bifunctional DNA primase-polymerase. *Nature structural & molecular biology*, 11(2), pp.157–62.
- Liu, L. et al., 2001. The archaeal DNA primase: biochemical characterization of the p41-p46 complex from *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of biological chemistry*, 276(48), pp.45484–90.
- Liu, P. et al., 2008. Removal of oxidative DNA damage via FEN1-dependent long-patch base excision repair in human cell mitochondria. *Molecular and cellular biology*, 28(16), pp.4975–87.
- Liu, P., Burdzy, A. & Sowers, Lawrence C, 2003. Repair of the mutagenic DNA oxidation product, 5-formyluracil. *DNA repair*, 2(2), pp.199–210.

- Liu, P. & Dimple, B., 2010. DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought? *Environmental and molecular mutagenesis*, 51(5), pp.417–26.
- Lodish, H. et al., 1999. *Molecular Cell Biology*, NY: W.H. Freeman & Co.
- Longley, M J et al., 1998. Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), pp.12244–8.
- Longley, M J, Pierce, A.J. & Modrich, P., 1997. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 272(16), pp.10917–21.
- Ma, Y. et al., 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108(6), pp.781–94.
- Major, P.P. et al., 1981. Correlation of thymidine-enhanced incorporation of ara-C in deoxyribonucleic acid with increased cell kill. *Biochemical pharmacology*, 30(16), pp.2221–4.
- Makarova, K.S. et al., 2002. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic acids research*, 30(2), pp.482–96.
- Marini, F. et al., 2003. POLN, a nuclear PolA family DNA polymerase homologous to the DNA cross-link sensitivity protein Mus308. *The Journal of biological chemistry*, 278(34), pp.32014–9.
- Martin, M.J. et al., 2013. Ribonucleotides and manganese ions improve non-homologous end joining by human Pol μ . *Nucleic acids research*, 41(4), pp.2428–36.
- Mason, P.A. et al., 2003. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic acids research*, 31(3), pp.1052–8.
- Mastrianni, D.M., Tung, N.M. & Tenen, D.G., 1992. Acute myelogenous leukemia: current treatment and future directions. *The American journal of medicine*, 92(3), pp.286–95.
- Masutani, C. et al., 1999. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature*, 399(6737), pp.700–4.
- Matsui, E. et al., 2003. Distinct domain functions regulating de novo DNA synthesis of thermostable DNA primase from hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*, 42(50), pp.14968–76.
- McIntyre, J. et al., 2013. Ubiquitin mediates the physical and functional interaction between human DNA polymerases η and ι . *Nucleic acids research*, 41(3), pp.1649–60.
- McMacken, R. & Kornberg, A., 1978. A multienzyme system for priming the replication of phiX174 viral DNA. *The Journal of biological chemistry*, 253(9), pp.3313–9.
- Mendelman, L. V, Beauchamp, B.B. & Richardson, C C, 1994. Requirement for a zinc motif for template recognition by the bacteriophage T7 primase. *The EMBO journal*, 13(16), pp.3909–16.
- Meselson, M. & Stahl, F.W., 1958. The replication of DNA. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 23, pp.9–12.
- Michikawa, Y. et al., 1999. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), pp.774–9.

- Mikita, T. & Beardsley, G.P., 1988. Functional consequences of the arabinosylcytosine structural lesion in DNA. *Biochemistry*, 27(13), pp.4698–705.
- Mills, K.D., Ferguson, D.O. & Alt, F.W., 2003. The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunological reviews*, 194, pp.77–95.
- Miquel, J. et al., 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Experimental gerontology*, 15(6), pp.575–91.
- Miyase, S. et al., 2005. Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono- and polyubiquitination. *The Journal of biological chemistry*, 280(1), pp.515–24.
- Morgan, W.F. et al., 1996. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiation research*, 146(3), pp.247–58.
- Moriya, M., 1993. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(3), pp.1122–6.
- Murzin, A.G., 1998. How far divergent evolution goes in proteins. *Current opinion in structural biology*, 8(3), pp.380–7.
- Mustaev, A.A. & Godson, G.N., 1995. Studies of the functional topography of the catalytic center of *Escherichia coli* primase. *The Journal of biological chemistry*, 270(26), pp.15711–8.
- Nakai, H. & Richardson, C C, 1986. Interactions of the DNA polymerase and gene 4 protein of bacteriophage T7. Protein-protein and protein-DNA interactions involved in RNA-primed DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 261(32), pp.15208–16.
- Nakai, H. & Richardson, C C, 1988. Leading and lagging strand synthesis at the replication fork of bacteriophage T7. Distinct properties of T7 gene 4 protein as a helicase and primase. *The Journal of biological chemistry*, 263(20), pp.9818–30.
- Nakamura, T. et al., 2012. Watching DNA polymerase η make a phosphodiester bond. *Nature*, 487(7406), pp.196–201.
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W. & Hinkle, D.C., 1996. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5268), pp.1646–9.
- Nick McElhinny, S. a et al., 2010. Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), pp.4949–54.
- Noirot-Gros, M.F. & Ehrlich, S.D., 1996. Change of a catalytic reaction carried out by a DNA replication protein. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5288), pp.777–80.
- Ohmori, H. et al., 2001. The Y-family of DNA polymerases. *Molecular cell*, 8(1), pp.7–8.
- Ohtsu, A. et al., 2003. A Phase II study of irinotecan in combination with 120-h infusion of 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal carcinoma: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9703). *Japanese journal of clinical oncology*, 33(1), pp.28–32.
- Ollis, D.L. et al., 1985. Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature*, 313(6005), pp.762–6.

- Pakendorf, B. & Stoneking, M., 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual review of genomics and human genetics*, 6, pp.165–83.
- Pan, H. & Wigley, D.B., 2000. Structure of the zinc-binding domain of *Bacillus stearothermophilus* DNA primase. *Structure (London, England: 1993)*, 8(3), pp.231–9.
- Pavletich, N.P. & Pabo, C.O., 1993. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5129), pp.1701–7.
- Pedrali-Noy, G. & Spadari, S., 1979. Effect of aphidicolin on viral and human DNA polymerases. *Biochemical and biophysical research communications*, 88(4), pp.1194–202.
- Pei, J. & Grishin, N V, 2001. GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins*, 42(2), pp.210–6.
- Perrino, F.W. & Mekosh, H.L., 1992. Incorporation of cytosine arabinoside monophosphate into DNA at internucleotide linkages by human DNA polymerase alpha. *The Journal of biological chemistry*, 267(32), pp.23043–51.
- Picher, A.J. & Blanco, Luis, 2007. Human DNA polymerase lambda is a proficient extender of primer ends paired to 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *DNA repair*, 6(12), pp.1749–56.
- Pinz, K.G., Shibutani, S. & Bogenhagen, D F, 1995. Action of mitochondrial DNA polymerase gamma at sites of base loss or oxidative damage. *The Journal of biological chemistry*, 270(16), pp.9202–6.
- Pitcher, R.S. et al., 2007. Structure and function of a mycobacterial NHEJ DNA repair polymerase. *Journal of molecular biology*, 366(2), pp.391–405.
- Poch, O. et al., 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO journal*, 8(12), pp.3867–74.
- Prakash, Satya, Johnson, Robert E & Prakash, Louise, 2005. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.317–53.
- Pratt, C.B. et al., 1994. Phase II study of 5-fluorouracil/leucovorin for pediatric patients with malignant solid tumors. *Cancer*, 74(9), pp.2593–8.
- Qian, X. et al., 1993. Novel zinc finger motif in the basal transcriptional machinery: three-dimensional NMR studies of the nucleic acid binding domain of transcriptional elongation factor TFIIS. *Biochemistry*, 32(38), pp.9944–59.
- Rai, K.R. et al., 2000. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 343(24), pp.1750–7.
- Ramirez-Aguilar, K. a., Low-Nam, N. a. & Kuchta, Robert D., 2002. Key Role of Template Sequence for Primer Synthesis by the Herpes Simplex Virus 1 Helicase–Primase †. *Biochemistry*, 41(49), pp.14569–14579.
- Ramirez-Aguilar, K.A. & Kuchta, Robert D, 2004. Mechanism of primer synthesis by the herpes simplex virus 1 helicase-primase. *Biochemistry*, 43(6), pp.1754–62.
- Ramsden, D.A., 2011. Polymerases in nonhomologous end joining: building a bridge over broken chromosomes. *Antioxidants & redox signaling*, 14(12), pp.2509–19.

- Richter, C., Park, J.W. & Ames, B.N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(17), pp.6465–7.
- Ropp, P.A. & Copeland, W C, 1996. Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics*, 36(3), pp.449–58.
- Rose, K.M., Bell, L.E. & Jacob, S.T., 1977. Specific inhibition of chromatin-associated poly(A) synthesis in vitro by cordycepin 5'-triphosphate. *Nature*, 267(5607), pp.178–80.
- Rowen, L. & Kornberg, A., 1978. A ribo-deoxyribonucleotide primer synthesized by primase. *The Journal of biological chemistry*, 253(3), pp.770–4.
- Ruiz, José F et al., 2003. Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic acids research*, 31(15), pp.4441–9.
- Salas, M., 1991. Protein-priming of DNA replication. *Annual review of biochemistry*, 60, pp.39–71.
- Sancar, A., 2003. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical reviews*, 103(6), pp.2203–37.
- Santi, D. V, McHenry, C.S. & Sommer, H., 1974. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*, 13(3), pp.471–81.
- Sawaya, M.R. et al., 1997. Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, 36(37), pp.11205–15.
- Seki, M., Marini, F. & Wood, R.D., 2003. POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. *Nucleic acids research*, 31(21), pp.6117–26.
- Sensi, P., MarGalith, P. & Timbal, M.T., 1959. Rifomycin, a new antibiotic; preliminary report. *// Farmaco; edizione scientifica*, 14(2), pp.146–7.
- Sharief, F.S. et al., 1999. Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. *Genomics*, 59(1), pp.90–6.
- Sheaff, R.J. & Kuchta, R D, 1993. Mechanism of calf thymus DNA primase: slow initiation, rapid polymerization, and intelligent termination. *Biochemistry*, 32(12), pp.3027–37.
- Sheaff, R.J., Kuchta, R D & Ilesley, D., 1994. Calf thymus DNA polymerase alpha-primase: "communication" and primer-template movement between the two active sites. *Biochemistry*, 33(8), pp.2247–54.
- Shippen-Lentz, D. & Blackburn, E.H., 1990. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4942), pp.546–52.
- Silvian, L.F. et al., 2001. Crystal structure of a DinB family error-prone DNA polymerase from *Sulfolobus solfataricus*. *Nature structural biology*, 8(11), pp.984–9.
- Simbulan, C.M. et al., 1994. Sphingosine inhibits the synthesis of RNA primers by primase in vitro. *Biochemistry*, 33(30), pp.9007–12.
- Singer, B. & Grunberger, D., 1983. *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, New York: Plenum Press.

- Singhal, R.K. & Wilson, S.H., 1993. Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive. *The Journal of biological chemistry*, 268(21), pp.15906–11.
- Slade, D. & Radman, M., 2011. *Oxidative stress resistance in Deinococcus radiodurans.*
- Slupphaug, G., 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1-2), pp.231–251.
- de Souza-Pinto, Nadja C et al., 2009. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA repair*, 8(6), pp.704–19.
- Steitz, T. a & Steitz, J. a, 1993. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), pp.6498–502.
- Stierum, R.H., Dianov, G.L. & Bohr, V A, 1999. Single-nucleotide patch base excision repair of uracil in DNA by mitochondrial protein extracts. *Nucleic acids research*, 27(18), pp.3712–9.
- Strauss, B.S., 1991. The “A rule” of mutagen specificity: a consequence of DNA polymerase bypass of non-instructional lesions? *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 13(2), pp.79–84.
- Suzuki, M. et al., 1989. DNA primase-DNA polymerase alpha assembly from mouse FM3A cells. Purification of constituting enzymes, reconstitution, and analysis of RNA priming as coupled to DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 264(17), pp.10065–71.
- Swart, J.R. & Griep, M.A., 1995. Primer synthesis kinetics by *Escherichia coli* primase on single-stranded DNA templates. *Biochemistry*, 34(49), pp.16097–106.
- Takata, M. et al., 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal*, 17(18), pp.5497–508.
- Tamiya-Koizumi, K. et al., 1997. Inhibition of DNA primase by sphingosine and its analogues parallels with their growth suppression of cultured human leukemic cells. *Biochemistry and molecular biology international*, 41(6), pp.1179–89.
- Tanaka, M. et al., 1981. Utilization of 5-fluoro-2'-deoxyuridine triphosphate and 5-fluoro-2'-deoxycytidine triphosphate in DNA synthesis by DNA polymerases alpha and beta from calf thymus. *Cancer research*, 41(10), pp.4132–5.
- Teebor, G.W., Frenkel, K. & Goldstein, M.S., 1984. Ionizing radiation and tritium transmutation both cause formation of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in cellular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(2), pp.318–21.
- Thyagarajan, B., Padua, R.A. & Campbell, C., 1996. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *The Journal of biological chemistry*, 271(44), pp.27536–43.
- Tissier, a et al., 2000. Misinsertion and bypass of thymine-thymine dimers by human DNA polymerase iota. *The EMBO journal*, 19(19), pp.5259–66.
- Trincao, J. et al., 2001. Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase eta: implications for translesion DNA synthesis. *Molecular cell*, 8(2), pp.417–26.

- Tseng, B.Y. & Ahlem, C.N., 1983. A DNA primase from mouse cells. Purification and partial characterization. *The Journal of biological chemistry*, 258(16), pp.9845–9.
- Ulrich, H.D., 2004. How to activate a damage-tolerant polymerase: consequences of PCNA modifications by ubiquitin and SUMO. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 3(1), pp.15–8.
- Ulrich, H.D., 2003. Protein-protein interactions within an E2-RING finger complex. Implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair. *The Journal of biological chemistry*, 278(9), pp.7051–8.
- Wagner, J.R., Hu, C.C. & Ames, B.N., 1992. Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), pp.3380–4.
- Walker, J.R., Corpina, R.A. & Goldberg, J., 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), pp.607–14.
- Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics*, 39, pp.359–407.
- Wang, B. et al., 1998. High-resolution structure of an archaeal zinc ribbon defines a general architectural motif in eukaryotic RNA polymerases. *Structure (London, England: 1993)*, 6(5), pp.555–69.
- Wang, T.S., Eichler, D.C. & Korn, D., 1977. Effect of Mn^{2+} on the in vitro activity of human deoxyribonucleic acid polymerase beta. *Biochemistry*, 16(22), pp.4927–34.
- Washington, M T et al., 1996. Biochemical analysis of mutant T7 primase/helicase proteins defective in DNA binding, nucleotide hydrolysis, and the coupling of hydrolysis with DNA unwinding. *The Journal of biological chemistry*, 271(43), pp.26825–34.
- Washington, M Todd et al., 2002. Human DINB1-encoded DNA polymerase kappa is a promiscuous extender of mispaired primer termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), pp.1910–4.
- Watanabe, K. et al., 2004. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *The EMBO journal*, 23(19), pp.3886–96.
- Watson, J.D. & Crick, F.H., 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), pp.737–8.
- Wilke, H. et al., 2000. [Infusiontherapy with 5-fluorouracil (“infusional” 5-FU) in solid tumors]. *Medizinische Klinik (Munich, Germany: 1983)*, 95 Suppl 1, pp.3–8.
- Wilson, S.H., 1998. Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutation research*, 407(3), pp.203–15.
- Wist, E. & Prydz, H., 1979. The effect of aphidicolin on DNA synthesis in isolated HeLa cell nuclei. *Nucleic acids research*, 6(4), pp.1583–90.
- Wong, T.W. & Clayton, D. a, 1985a. *In vitro* replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell*, 42(3), pp.951–8.
- Wong, T.W. & Clayton, D. a, 1985b. Isolation and characterization of a DNA primase from human mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 260(21), pp.11530–5.

- Yakes, F.M. & Van Houten, B., 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(2), pp.514–9.
- Yang, Wei, 2011. Surviving the sun: repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 20(11), pp.1781–9.
- Yang, Wei & Woodgate, Roger, 2007. What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), pp.15591–8.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P. & Bestor, T.H., 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in genetics: TIG*, 13(8), pp.335–40.
- Yuzhakov, A., Kelman, Z & O'Donnell, M., 1999. Trading places on DNA--a three-point switch underlies primer handoff from primase to the replicative DNA polymerase. *Cell*, 96(1), pp.153–63.
- Zerbe, L.K. & Kuchta, Robert D, 2002. The p58 subunit of human DNA primase is important for primer initiation, elongation, and counting. *Biochemistry*, 41(15), pp.4891–900.
- Zhang, Y. et al., 2002. Lesion bypass activities of human DNA polymerase mu. *The Journal of biological chemistry*, 277(46), pp.44582–7.
- Zhou, B.L., Pata, J.D. & Steitz, T.A., 2001. Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Molecular cell*, 8(2), pp.427–37.



